

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan ko.

Bioteknikka

2013

Suvi Hyvönen

KVANTITATIIVISEN REAALIAIKAISEN PCR- MENETELMÄN PYSTYTTÄMINEN PATOGEENISTEN A-RYHMÄN STREPTOKOKKIEN OSOITUSDIAGNOSTIIKKA VARTEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Suvi Hyvönen

KVANTITATIIVISEN REAALIAIKAISEN PCR-MENETELMÄN PYSTYTTÄMINEN PATOGEENISTEN A-RYHMÄN STREPTOKOKKIEN OSOITUSDIAGNOSTIIKKA VARTEN

Streptococcus pyogenes -bakteerin eri kannoista käytetään yhteisnimitystä A-ryhmän streptokokit. A-ryhmän streptokokit aiheuttavat ihmiselle immuunipuolustuksen heiketessä infektiosairauksia, joista yleisin on nielurisatuledus. Hoitamattomana Streptokokki A voi aiheuttaa vakavan yleisinfektion, joka pahimmillaan voi johtaa potilaan kuolemaan. Tämän vuoksi bakteerin nopea ja luotettava diagnosointi on tärkeää. Tämä on kuitenkin haastavaa, sillä *Streptococcus pyogeneksesta* tunnetaan satoja eri kantoja, joilla kaikilla on erilaiset geenisekvenssit. Lisäksi myös jotkin *S. pyogeneksen* kanssa lähisukuiset bakteerit, kuten *Streptococcus dysgalactiae subs. equisimilis* ilmentävät A-ryhmän streptokokkien diagnosointiin perinteisesti käytettyä Lancefieldin A-ryhmän antigeeniä.

Tutkimus toteutettiin ArcDia International Oy Ltd:n toimeksiantona. Tutkimuksen tarkoituksena oli pystyttää reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-menetelmä, joka olisi vähintään yhtä herkkä kuin yhtiön kehittämä mariPOC[®]-pikatestimenetelmä. Testeillä saatuja tuloksia voitaisiin tällöin verrata keskenään, ja varmentaa mariPOC[®]-illa saatuja matalia positiivisia testituloksia. Työn tavoitteena oli testata Molekyyli diagnostiikan laboratorion testeissä aiemmin optimoituja alukkeita ja lyhyttä UPL-hydrolyysikoetinta ja tutkia eri streptokokkilajien puhdasviljelmänäytteiden sekä kliinisten potilasnäytteiden reagoimista qPCR-testissä.

Tutkimuksessa päästiin vaiheeseen, jossa testillä voitiin todeta positiivisiksi näytteet, joiden kohdebakteeripitoisuus 357 bakteeria näytekuppassa (10 µl). MariPOC[®]:in tarkkuus puolestaan on 500 CFU millilitrassa. Testeissä *Streptococcus mitis* reagoi tuottaen väärän positiivisen tuloksen, joten testiin valittu koetin ei ollut riittävän spesifinen. Seuraavat vaiheet testin kehittämisessä ovat pidemmän ja spesifisemmän koettimen, positiivisen kontrollitemplaatin (kohde-DNA:n kvantitointi standardisuoralta) sekä sisäisen kontrollitemplaatin (testin toiminnan ja negatiivisten tulosten varmentaminen) suunnittelu ja testaaminen.

ASIASANAT:

Diagnostiikka, streptokokit, polymeraasiketjureaktio

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2013 | 43 pages

Instructor: Annika Brandt (PhD)

Suvi Hyvönen

QUANTITATIVE REAL-TIME PCR METHOD SET-UP FOR INDICATION DIAGNOSTICS OF PATHOGENIC GROUP A STREPTOCOCCI

The different strains of *Streptococcus pyogenes* are commonly referred to as Group A Streptococci. When the body immune system weakens, Group A Streptococci may cause infectious diseases. The most common of these diseases is pharyngitis. If untreated, Group A streptococci may cause a severe general infection which at its worst may lead to death. This is why fast and accurate diagnostics of the bacterium is important. This can, however, be challenging as there are hundreds of identified strains of *Streptococcus pyogenes*, all of which have different genomes. In addition some closely related species such as *Streptococcus dysgalactiae subs. equisimilis* express the Lancefield group A antigen which has traditionally been used for the diagnostics of Group A streptococci.

The study was commissioned by ArcDia International Oy Ltd. The objective of the study was to set up a quantitative real-time PCR assay which would be as sensitive as the company's mariPOC[®] point-of-care assay. This would enable the comparison of the test results acquired with both tests and hence the verification of the low positive results acquired with the mariPOC[®] assay. The goal in this thesis was to test the primers and the short UPL hydrolysis probe which had been optimized in the earlier studies in the Molecular Diagnostic Laboratory and to study the responses in the qPCR test of both pure culture samples of different *Streptococcus* species and clinical samples.

The study reached a point where samples which contained 357 bacteria in a sample well (10 µl) gave a positive response, whereas the test accuracy of MariPOC[®] is 500 CFU/ml. In the test *Streptococcus mitis* gave a false positive response so the probe which had been selected for the test was not sufficiently specific. The next phases in the development of the test are the design and testing of a longer, more specific probe, the design and testing of a positive control template (for quantification of the target DNA from a standard curve) and the design and testing of an internal control template (for verification of the functionality of the test and the negative results).

KEYWORDS:

diagnostics, streptococci, polymerase chain reaction

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	8
1.1 Tutkimuksen tavoitteet	8
1.2 Patogeeniset A-ryhmän streptokokit	8
1.3 Polymeraasiketjureaktio	9
1.3.1 PCR:n periaatteet	9
1.3.2 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	11
1.3.3 PCR A-ryhmän streptokokkien diagnostiikassa	13
2 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	15
2.1 DNA:n eristys puhdasviljelmistä	15
2.1.1 Solujen hajotus	15
2.1.2 Fenoli-kloroformi-uuttomenetelmät	16
2.1.3 PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent	16
2.2 DNA:n puhtauden ja pitoisuuden määrittäminen	17
2.3 qPCR	18
2.3.1 Kohdegeeni, alukkeet ja templaatti	18
2.3.2 Koetin	18
3 KOKEELLINEN OSUUS	20
3.1 Kontrollinäytteiden valmistus bakteeripuhdasviljelmistä	20
3.1.1 Käytetyt puhdasviljelmät	20
3.1.2 Näytteiden käsittely	21
3.1.2.1 Fenoli-kloroformi-uuttomenetelmät	21
3.1.2.2 Lämpökäsittely	25
3.1.2.3 PrepMan® Ultra -käsittelyt	26
3.1.3 PCR-näytteiden valitseminen	27
3.2 Alukkeiden ja koettimien sopivuuden tarkistus	28
3.3 qPCR:n testaus	29
3.3.1 SYBR green -testi	29
3.3.2 Probes master -ajot	30

4 TULOKSET	39
4.1 Testin spesifisyys	39
4.2 Testin tarkkuus	39
5 PÄÄTELMÄT	41
5.1 Ristireagoivat lajit ja PCR-inhibiittorit	41
5.2 Spesifisyys	41
5.3 Tarkkuus ja kvantitatiivisuus	41
5.4 Positiivinen kontrollitemplaatti ja sisäinen kontrollitemplaatti	42
5.5 Kliiniset näytteet	43
5.6 PCR-testin tuotteistaminen	43
LÄHTEET	44

LIITTEET

- Liite 1. ArcDia International Oy Ltd:n toimittamat puhdasviljelmänäytteet.
 Liite 2. Fenoli-kloroformiuuttojen työohjeet.
 Liite 3. NanoDropilla saadut mittaustulokset solupellettien supernatanteista ja PrepMan® Ultra -reagenssilla käsitellyistä näytteistä.
 Liite 4. Koettimien paikat ptsI-geenin *Streptococcus Pyogenes* Manfredo-kannassa.
 Liite 5. Esimerkki BLAST®-rinnastuksesta.
 Liite 6. Clustal Omega -rinnastus.
 Liite 7. Light Cycler 480® SYBR Green Master -työohje.
 Liite 8. Light Cycler 480® Probes Master -työohje.

KUVAT

- Kuva 1. Esimerkkejä koettimien toiminnasta. Vasemmalla hydrolyysikoetin, keskellä hybridisaatiokoetin ja oikealla Molecular Beacon -koetin. 12
 Kuva 2. NanoDropille tyypillinen DNA-käyrän muoto. 17
 Kuva 3. Hydrolyysikoettimen toiminta PCR-reaktiossa. 19
 Kuva 4. Ensimmäisen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaaja. 30
 Kuva 5. Toisen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaaja. 32
 Kuva 6. Kolmannen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaaja. 36
 Kuva 7. Neljännen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaajat. 37

TAULUKOT

Taulukko 1. Opinnäytetyössä tutkitut bakteerikannat	20
Taulukko 2. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje I; <i>S. pyogenes</i> ja <i>S. mutans</i> .	21
Taulukko 3. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje I; <i>E. coli</i> .	22
Taulukko 4. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje I; <i>S. mitis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i> ja <i>S. pyogenes</i> .	23
Taulukko 5. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje II; Str A positiivinen kontrolli ja <i>S. aureus</i>	24
Taulukko 6. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, sonikoidut näytteet; Str A positiivinen kontrolli, <i>S. bovis</i>	25
Taulukko 7. NanoDrop-mittausten tulosten keskiarvot.	27
Taulukko 8. Ensimmäisen koettimellisen testiajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.	31
Taulukko 9. Toisen koettimellisen testiajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.	32
Taulukko 10. <i>Streptococcus pyogenes</i> -laimennossarja.	34
Taulukko 11. Kolmannen koettimellisen ajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.	35
Taulukko 12. <i>S. mitis</i> , <i>S. pyogenes</i> ja <i>S. aureus</i> -laimennossarjat.	36
Taulukko 13. Neljännen koettimellisen ajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.	38

KÄYTETYT LYHENTEET

PCR	polymeraasiketjureaktio
qPCR	kvantitatiivinen, reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio
DNA	deoksiribonukleiinihappo
RNA	ribonukleiinihappo
ATCC	American Type Culture Collection
OD600	Optinen tiheys (Optical Density) aallonpituudella 600 nm
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Milli-Q	vedenpuhdistusjärjestelmä (Millipore Corporation)
UPL	Universal Probe Library (Roche Applied Science)

1 JOHDANTO

1.1 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimus toteutettiin ArcDia International Oy Ltd:n toimeksiantona. Tutkimuksen tavoitteena oli pystyttää reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-menetelmä, jota voidaan käyttää yhtiön kehittämällä uudella mariPOC[®]-pikatestimenetelmällä saatujen tulosten todentamiseen. Tarve testille tuli ArcDia:lta, jonka antigeenitunnistukseen perustuvassa pikatestissä ristiriitaisia tuloksia antaneiden näytteiden käyttäytymistä halutaan verrata qPCR-testissä DNA:n perusteella saatuihin tuloksiin. MariPOC[®]-testijärjestelmä hyödyntää patentoitua ArcDia[™] TPX-teknologiaa, joka perustuu kaksoisfotoniviritteiseen fluoresenssiin. Tekniikan avulla voidaan tunnistaa nielu- ja hengitystietulehdusten aiheuttajat nopeasti ja spesifisesti potilasnäytteessä olevien antigeenien tunnistuksen avulla.¹

1.2 Patogeeniset A-ryhmän streptokokit

A-ryhmän streptokokeiksi kutsutaan yleisesti *Streptococcus pyogenes* -bakteerikantoja. *S. pyogenes* on grampositiivinen kokkibakteeri, joka kasvaa useimmiten pareina tai ketjuina.² A-ryhmän streptokokit ilmentävät Lancefieldin A-ryhmän antigeeniä, joka toimii kohdeantigeeninä ArcDia:n mariPOC[®]-testissä. Kuitenkin myös eräät muut streptokokit, kuten *Streptococcus dysgalactiae* subs. *equisimilis* voivat ilmentää tätä antigeeniä³, mikä vaikeuttaa *S. pyogenes*en spesifistä tunnistamista.

*Streptococcus pyogenes*en soluseinän uloimman kerroksen rakenne on hyaluronihappoa. Hyaluronihappoa on myös mm. ihmisen sidekudoksessa, joten se on huonosti immunogeenistä. Näin ollen hyaluronihappo suojaa bakteeria fagosytoosilta. *S. pyogenes* tarttuu herkästi pisara- ja kosketustartuntana. Lähes aina tartuttajana on ihminen. Oireilevien potilaiden lisäksi *S. pyogenes* voi tarttua myös oireettomista kantajista.⁴

Streptococcus pyogenes aiheuttaa eniten infektioita lapsille ja nuorille aikuisille, mutta myös vanhuksille. Tyypillisimmin *S. pyogenes* aiheuttaa nielutulehduksia, joiden tavanomaisia oireita ovat kurkkukipu, nielurisojen voimakas tulehdus, leuan alusen ja kaulan suurentuneet, aristavat imusolmukkeet sekä kuume. Muita *S. pyogeneksen* aiheuttamia, vakavampia infektioitauteja ovat peritonsillaarinen absenssi (kurkkupaise), tulirokko, ruusu, märkärupi ja toksinen sokki -tyyppinen oireyhtymä. Myös haavainfektioissa tavataan *S. pyogenesta*. *S. pyogeneksen* läsnäolo tekee tulehduksesta vakavamman, koska sillä on taipumus levitä infektiotalueelta ympäröiviin kudoksiin.⁴

Vaikka streptokokit aiheuttavat pääasiassa nielutulehduksia, kuitenkin vain kolmasosa kaikista nielutulehduksista on streptokokkien aiheuttamia. Tämän takia on tärkeää saada diagnosoitua *S. pyogeneksen* aiheuttamat nieluinfektiot spesifisesti, jotta tarvittava lääkitys saadaan kohdennettua oikein ja aloitettua nopeasti. Streptokokki-infektioita hoidetaan antibiooteilla, joista yleisimmin käytetty on penisilliini. Tarkalla diagnosoinnilla voidaan vähentää turhaa antibioottien käyttöä, kun streptokokin aiheuttamat infektiot saadaan aikaisessa vaiheessa erotettua muista hengitystieinfektioista. Lääkityksen nopea aloitus ehkäisee osaltaan myös epidemioiden syntymistä esimerkiksi päiväkodeissa.⁴

1.3 Polymeraasiketjureaktio

1.3.1 PCR:n periaatteet

Polymeraasiketjureaktio (PCR, engl. polymerase chain reaction) on menetelmä, jolla tuotetaan kaksijuosteisia DNA-kopioita. PCR:llä monistetaan DNA-jaksoja, jotka ovat kahden nukleotidijärjestykseltään tarkasti tunnetun DNA-jakson välissä. PCR:n toiminta perustuu alukkeisiin, jotka ovat lyhyitä, synteettisesti valmistettuja yksijuosteisia DNA-jaksoja, joiden emäsjärjestys tunnetaan tarkasti. Alukkeet valitaan niin, että ne liittyvät kohde- eli templaatti-DNA:n tunnettuihin jaksoihin monistettavan alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeet muodostavat DNA-polymeraasientsyymille synteessin aloituskohdan.

Templaattina voi toimia joko denaturoitu kaksijuosteinen DNA tai RNA:sta käänteistranskriptaasilla valmistettu yksijuosteinen cDNA.⁵

PCR-reaktioissa käytetään korkeaa lämpötilaa kestävää DNA-polymeraasientsyymiä, joka ei inaktivoidu korkeissa, lähes 100 °C lämpötiloissa. Tämä ominaisuus on tarpeen, sillä kaksijuosteinen DNA tulee denaturoida, eli DNA-juosteiden tulee irrota toisistaan, jotta PCR-reaktio voi tapahtua. Denaturointiaika ja lämpötila riippuvat templaatin pituudesta, joskus myös templaatin emäsjärjestyksestä, sekä PCR-laitteen tyypistä ja käytetystä reaktioastiasta.⁶ Yleisimmin DNA:n denaturointiin tarvitaan noin 95 °C:n lämpötila. Alukkeiden ja DNA-polymeraasin lisäksi PCR-reaktioseoksessa on vapaita nukleotideja, joista DNA-polymeraasi rakentaa uusia DNA-kopioita. Alukkeita ja vapaita nukleotideja tulee olla reaktioseoksessa huomattava ylimäärä templaatti-DNA:han nähden.⁵

PCR-reaktioiden toteuttamiseen käytetään ohjelmoitavia PCR-laitteita, joiden lämpötilaa pystytään säätelemään. Polymeerasiketjureaktio koostuu kolmesta vaiheesta, jotka kukin vaativat oman lämpötilansa. Ensimmäisessä vaiheessa templaatti-DNA denaturoidaan kuumennuskäsittelyllä.⁵ Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, jolloin alukkeet pystyvät kiinnittymään templaatti-DNA:han, mutta itse templaatti ei ehdi renaturoitua (annealing-vaihe). Kolmannessa vaiheessa lämpötilaa nostetaan hieman, käytettävän DNA-polymeraasin optimialueelle, jolloin DNA-polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksen vapaita nukleotideja alukkeen 3'-päästä alkaen uudeksi DNA-juosteeksi templaatti-DNA:n mallin mukaisesti (ekstensiovaihe). Näiden kolmen vaiheen sarjaa kutsutaan sykliksi.⁵

Ensimmäisen PCR-syklin aikana kahdesta DNA-juosteesta syntyy neljä juostetta, toisen syklin aikana neljästä juosteesta kahdeksan juostetta, kolmannen syklin aikana kahdeksasta 16 ja niin edelleen. DNA-kopioiden määrä kasvaa siis eksponentiaalisesti syklien toistuessa, kunnes reaktioseoksesta loppuvat alukkeet tai vapaat nukleotidit.⁵

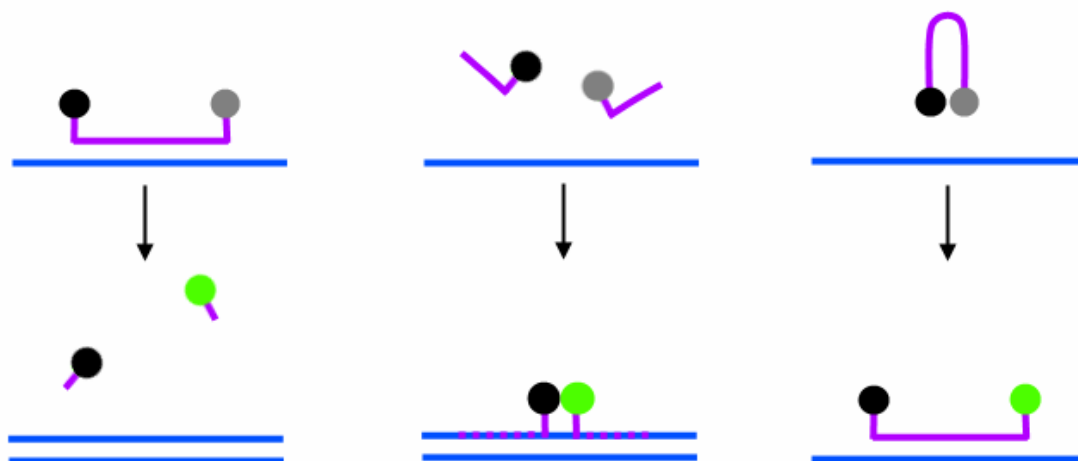
1.3.2 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR) on PCR:n sovellus, jossa DNA-kopioiden muodostumista seurataan reaaliaikaisesti tietokoneella. Menetelmä perustuu fluoresoivaan väriaineeseen, joka reagoi muodostuvan tuotteen kanssa. Fluoresenssia mittaamalla voidaan seurata tuotteen muodostumista reaktioseokseen. Reaaliaikaista PCR:ää käyttämällä voidaan näytteen positiivisuuden tai negatiivisuuden lisäksi määrittää kohde-DNA:n määrä alkuperäisessä näytteessä, mikä on huomattava etu perinteiseen PCR:ään verrattuna.⁶

Fluoresoivia merkkiaineita käytetään kahdella tavalla: epäspesifisesti ja spesifisesti. Epäspesifisissä menetelmissä väri, kuten SYBR Green I (Life Technologies), on vapaana reaktioseoksessa, jolloin se ei fluoresoi käytännössä lainkaan. Fluoresenssi voimistuu väriaineen sitoutuessa muodostuviin DNA-kopioihin. Epäspesifisiä DNA:han sitoutuvista väriaineista tekee se, että ne sitoutuvat samalla tavalla mihin tahansa kaksijuosteiseen DNA:han. Spesifisissä menetelmissä väriaine on sidottu templaatti-DNA:n sekvenssin suhteen spesifiseen koettiin. Koettimen pohjana on nukleiinihapposekvenssi tai nukleiinihappoja vastaava synteettinen sekvenssi, johon fluoresoiva väriaine on kiinnitetty. Väriaineita on kahdenlaisia: väriaineita, joiden fluoresenssi on voimakas, mutta peitetään sammuttajavärillä, ja väriaineita, joiden fluoresenssiominaisuudet muuttuvat niiden sitoutuessa DNA:han.⁶

Esimerkkejä koettimista, joiden rakenteeseen kuuluu kaksi väriainetta (fluoresoiva väri ja sammuttajaväri) ovat hydrolyysikoettimet, Molecular Beacon -koettimet ja hybridisaatiokoettimet. Hydrolyysikoettimissa väriaineen fluoresenssi voimistuu, kun se irtaantuu sammuttajavärin läheisyydestä DNA-polymeraasin pilkkoessa kopioitavaan DNA:han kiinnittyneen koettimen. Hybridisaatiokoettimissa koetin on kaksiosainen, ja fluoresenssi voimistuu, kun koetin sitoutuu kopioitavaan DNA:han niin, että väriaineiden välinen etäisyys on pieni. Molecular Beacon -koettimien rakenne muodostaa silmukan, jossa

väriaineet ovat lähellä toisiaan. Fluoresenssi voimistuu, kun koetin oikeenee sitoutuessaan DNA:han. Esimerkkejä koettimista, joiden rakenteeseen kuuluu yksi väriaine, jonka fluoresenssiominaisuudet muuttuvat koettimen sitoutuessa DNA:han ovat muun muassa LightUp-koettimet, AllGlo-koettimet ja Simple probe -koettimet (Kuva 1.). Hyvän koettimen ominaisuuksia ovat matala taustafluoresenssi, korkea fluoresenssi templaatin kanssa reagoidessa ja korkea spesifisyys.⁶



Kuva 1. Esimerkkejä koettimien toiminnasta. Vasemmalla hydrolyysikoetin, keskellä hybridisaatiokoetin ja oikealla Molecular Beacon -koetin.

Kun tuotetta muodostuu, näytteen fluoresenssin voimakkuus kasvaa samassa suhteessa. Koska DNA-määrä kasvaa eksponentiaalisesti, myös fluoresenssin voimakkuuden kasvu on eksponentiaalista, kunnes DNA-kopioiden muodostuminen loppuu eikä fluoresenssin voimakkuus enää kasva.⁶ Templaatti-DNA:n määrä näytteessä voidaan määrittää asettamalla fluoresenssille kynnyisarvo, jonka ylittyessä näyte määritellään positiivisesti. Syklimäärää, jolla kynnyisarvo ylitetään, kutsutaan näytteen CT- (cycles required to reach threshold) tai Cq- (quantification cycle) arvoksi.⁶ Mitä pienempi CT-arvo, sitä enemmän templaatti-DNA:ta näytteessä on ollut.

1.3.3 PCR A-ryhmän streptokokkien diagnostiikassa

A-ryhmän streptokokkien diagnosointiin käytetään yleisesti viljelyä, pikaviljelyä tai kaupallisia pikatestejä. Viljely on varmin menetelmä streptokokki A:n osoittamiseen kaikista näytteistä. Näyte otetaan infektiokohdasta tikulla tai punktoimalla, jonka jälkeen näyte siirrostetaan verimaljalle. Usein käytetään myös selektiivisiä elatusaineita, jotka helpottavat streptokokkien löytämistä. A-ryhmän streptokokit muodostavat verimaljalla ympärilleen kirkkaan hemolyysirenkaan 18-24 tunnissa, mutta niiden erottaminen muiden hemolyyttisten bakteerien joukosta vaatii kokemusta. Hemolyyttiseksi tunnistettu streptokokki voidaan ryhmittää nopeasti ja helposti agglutinaatiotestillä, mutta on huomioitava, että myös muut streptokokit agglutinoituvat. Toinen tapa tunnistaa A-ryhmä on basitrasiinitesti. A-ryhmän streptokokeista n. 97 % on sille herkkiä, mutta siihen reagoi myös osa C- ja G-ryhmien streptokokeista.⁴

Nielunäytteiden tutkimiseen kehitettyä pikaviljelyä käytetään yleisesti terveyskeskuksissa. Tikulla otettu näyte levitetään kaupalliselle viljelyalustalle, ja viljelmän päälle asetetaan basitrasiinikiekko. Tulos on luettavissa seuraavana päivänä. Pikatestin tulosten tulkinta vaatii koulutusta, jonka jälkeen negatiiviset tulokset on melko helppo tunnistaa. Positiivisista tuloksista tulee kuitenkin suorittaa jatkoviljely streptokokkiryhmän tunnistamiseksi. Kaupalliset pikatestit puolestaan perustuvat A-ryhmän antigeenin tunnistamiseen suoraan nielunäytteestä. Tulos varmistuu 15–20 minuutissa, mutta eri testien luotettavuuden välillä on suuria eroja.⁴

PCR-testauksella on monia etuja perinteisiin testimenetelmiin verrattuna. Optimoitu PCR-testi on tarkka ja spesifinen. Sillä voidaan tunnistaa *Streptococcus pyogenes* -DNA muista näytteessä olevista bakteereista riippumatta. Testin onnistumiseen ei myöskään vaikuta bakteerien elinkelpoisuus, vaan testi voidaan suorittaa onnistuneesti myös kuolleista bakteereista, kunhan näytteessä on DNA:ta. PCR-testi voidaan periaatteessa suorittaa onnistuneesti jo yhdestä kohde-DNA-kopiosta näytteessä. q-PCR-

testaus on myös nopeaa, sillä testin etenemistä voidaan seurata reaaliaikaisesti, jolloin vahvat positiiviset tulokset ovat todettavissa jo alle tunnin kuluttua testin aloittamisesta.

Streptokokkien ollessa kyseessä PCR:n käyttö käytännön diagnostiikassa on kuitenkin vähäistä, sillä perinteisiin menetelmiin verrattuna PCR-testaus on työlästä ja vaatii erityistä tarkkuutta, jotta vääriä positiivisilta tuloksilta vältyttäisiin. Testit eivät myöskään yleensä ole standardoituja, joten niiden välillä esiintyy suuria herkkyyseroja. Usein tulos antaa vain viitteellisen arvion mikrobien todellisesta määrästä näytteessä, jolloin tulosten tulkinta on hankalaa.⁷

2 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

2.1 DNA:n eristys puhdasviljelmistä

Tutkimuksen toteuttamiseksi bakteeripuhdasviljelmänäytteistä haluttiin eristää genominen DNA. DNA:n eristämiseksi solut hajotettiin, jonka jälkeen DNA:n eristystä näytteestä kokeiltiin fenoli-kloroformi-eristysmenetelmillä, sekä kaupallisella PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent -reagenssilla. DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittämiseen käytettiin NanoDrop ND1000 -spektrofotometriä.

2.1.1 Solujen hajotus

Jotta DNA:ta voitaisiin tutkia, se täytyy saada vapautetuksi soluista. Tämän toteuttamiseksi bakteerien soluseinät täytyy hajottaa. Soluseinät voidaan rikkoa entsymaattisesti tai mekaanisesti.

Bakteerien soluseinien entsymaattiseen hajottamiseen käytetään yleisesti soluseinien komponentteja pilkkovia entsyymejä, kuten lysotsyymiä ja proteinaasi K:ta. Koska streptokokit ovat grampositiivisia bakteereita, niiden hajottaminen entsymaattisesti on haasteellista. Entsyymit, jotka tehoavat yleisesti gramnegatiivisiin bakteereihin ovat usein huonotehoisia tai jopa täysin tehottomia grampositiivisten bakteerien hajotuksessa.⁸

Mekaanisia menetelmiä voidaan käyttää yksin tai niillä voidaan heikentää bakteerien soluseiniä entsymaattisten menetelmien toiminnan tehostamiseksi. Bakteerisolujen soluseinien rikkomiseen käytettäviä mekaanisia menetelmiä ovat muun muassa sonikointi, jossa solususpensiota käsitellään ultraäänellä, ja helmimylly, jossa bakteerisuspensiota ravistetaan voimakkaasti pienien lasihelmien kanssa.⁹ Bakteerien soluseinien mekaanisiin hajotusmenetelmiin voidaan lukea myös keittämis- ja pakastusmenetelmät.¹⁰ Streptokokkien

hajottaminen mekaanisilla menetelmillä on kuitenkin haastavaa niiden pyöreän muodon vuoksi.

2.1.2 Fenoli-kloroformi-uuttomenetelmät

DNA voidaan eristää vesiliuoksessa olevasta näytteestä käsittelemällä näyte fenolin, kloroformin ja isoamyylialkoholin seoksella. Orgaaniset liuottimet muodostavat keskenään yhden faasin, ja vesiliuos toisen faasin. Voimakkaasti ravisteltaessa faasit muodostavat emulsion. Proteiinit saostuvat faasien rajapinnalla. Faasit erotetaan sentrifugoimalla, jolloin proteiinit jäävät faasien rajapinnalle ja nukleiinihapot voidaan kerätä talteen vesifaasin mukana.¹¹ Vesifaasissa on DNA:n lisäksi RNA:ta, joka voidaan tarvittaessa hajottaa RNAasi-entsyymikäsittelyllä.

Fenoli-kloroformiuuton jälkeen vesiliuoksessa on usein vielä jäljellä epäpuhtauksia, jolloin DNA voidaan saostaa etanolilla. Nukleiinihapot saostuvat suoloina, joten saannon parantamiseksi liuokseen voidaan lisätä jokin kationi (esim. Na⁺-ioni). Saostettu DNA erotetaan vesiliuoksesta sentrifugoimalla ja puhdas DNA-pelletti liuotetaan uudelleen näytepuskuriin.¹¹

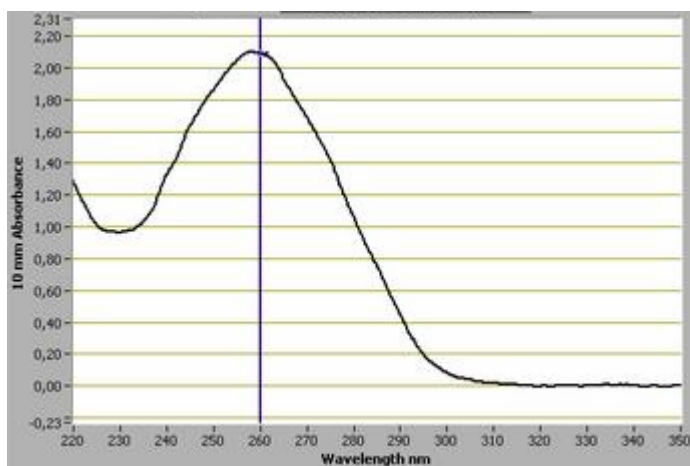
2.1.3 PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent

PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent on Applied Biosystems[™]:in valmistama, tutkimuskäyttöön tarkoitettu kaupallinen reagenssi, jota voidaan käyttää genomisten DNA-näytteiden valmistamiseen muunmuassa ruoka-aineista (patogeenien etsiminen), bakteereista, nisäkäskudosnäytteistä tai verestä. Reagenssia voidaan käyttää yhtälailla grampositiivisten kuin gramnegatiivisten bakteerien käsittelyyn.¹²

2.2 DNA:n puhtauden ja pitoisuuden määrittäminen

DNA:n puhtaus ja pitoisuus liuoksessa määritettiin NanoDrop ND1000 –spektrofotometrillä. NanoDropilla mittaus suoritetaan suoraan 1-2 µl suuruudesta nestepisarasta, joka pipetoidaan laitteen näytepaikkaan. Laitteen ohjelmistoon kuuluu erityisesti DNA-mittauksiin soveltuva ohjelma, jolla DNA:n pitoisuus ja puhtaus voidaan määrittää. DNA absorboi valoa aallonpituudella 260 nm, jolloin absorbanssin suuruuden perusteella voidaan määrittää DNA:n pitoisuus liuoksessa.¹³

DNA:n puhtauden määrittämiseksi laite laskee absorbanssien suhteen aallonpituuksilla 260 ja 280 nm. Kun näyte sisältää puhdasta kaksijuosteista DNA:ta, näiden aallonpituuksien suhde (A_{260}/A_{280}) on noin 1,8. Tätä huomattavasti matalampi arvo kertoo epäpuhtauksista, kuten proteiineista tai fenoleista, jotka absorboivat voimakkaasti 280 nm aallonpituudella tai sen lähellä.¹³ Myös nanoDropin piirtämän fluoresenssikäyrän muodosta voidaan päätellä sisältääkö näyte DNA:ta (Kuva 2.).



Kuva 2. NanoDropille tyypillinen DNA-käyrän muoto.

Tutkimuksessa käytettäväksi hyväksyttiin DNA-näytteet, joiden absorbanssisuhde A_{260}/A_{280} oli 1,8-2,0. DNA-pitoisuuden näytteessä tuli olla NanoDropin mukaan vähintään 25 ng/µl, jotta mittaustulosten luotettavuuden voitiin todeta olevan riittävä.

2.3 qPCR

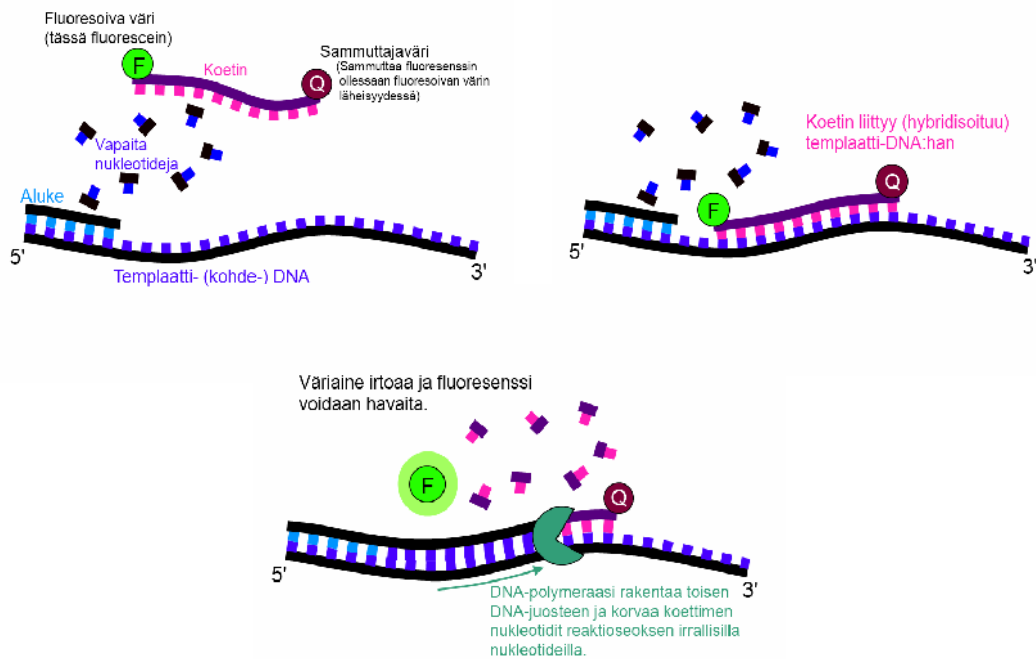
Turun AMK:n molekyyli diagnostiikan laboratoriossa qPCR-työt suoritetaan Roche Applied Sciences LightCycler® 480 -järjestelmällä. Itse PCR-laitteen lisäksi järjestelmä kattaa tulosten lukemiseen ja käsittelyyn tarvittavan ohjelmiston, PCR-reagenssit ja laitteessa näyteastioina käytettävät kuoppalevyt.¹⁴

2.3.1 Kohdegeeni, alukkeet ja templaatti

Molekyyli diagnostiikan laboratoriossa aikaisemmin suoritettujen esitestien perusteella *Streptococcus pyogenes* -bakteerin genomista oli valittu PCR:n kohdegeeniksi ptsI-geeni. Alukkeiksi valittiin esitesteissä hyviä tuloksia tuottaneet GEptsIF234 (Oligomer Oy, lot 10204M1G05 5/6, AATGCGTGCGCTTCTTCGTGC) ja TJTrev (Oligomer Oy, lot 10405M1H03 2/6, TACCTTCAGCGTGCGCTGCT).

2.3.2 Koetin

Koettimena tutkimuksessa käytettiin Universal ProbeLibrary:n koetinta #74 (Roche Applied Sciences, lot 70276903, exp Feb 2013, GGCAGCAG). Käytetty koetin on lyhyt hydrolyysikoetin, jonka 5'-päähän on liitetty fluoresoiva fluorescein-väriaine ja 3'-päähän tumma sammuttajaväri.¹⁵ Sammuttajaväri vaimentaa fluoresoivan värin lähettämän fluoresenssisignaalin, kun väriaineet ovat lähellä toisiaan. PCR-reaktiossa koetin sitoutuu kohde-DNA:han, jonka jälkeen DNA-polymeraasientsyymi pilkkoo koettimen nukleotideiksi uuden DNA-juosteen rakentamisen yhteydessä. Kun väriaineet vapautuvat fluoresoiva väriaine pääsee toimimaan vapaasti ja fluoresenssin voimistumisesta voidaan havaita PCR-tuotteen muodostuminen (Kuva 3.).



Kuva 3. Hydrolyysikoettimen toiminta PCR-reaktiossa.

Jos koetin ei sitoudu näyte-DNA:han, eli näyte-DNA:n sekvenssi ei vastaa koettimen sekvenssiä, koettinta ei pilkota ja siten fluoresenssin määrä näytteessä ei kasva, vaikka käytetyt alukkeet tuottaisivatkin näyte-DNA:sta kopioita.¹⁶ Näin ollen koettimen käyttö tekee testistä spesifisemmän kuin pelkän DNA-ketjujen väliin sitoutuvan väriaineen (esim. SYBR green) käyttö.

3 KOKEELLINEN OSUUS

3.1 Kontrollinäytteiden valmistus bakteeripuhdasviljelmistä

3.1.1 Käytetyt puhdasviljelmät

ArcDia Oy:ltä saatiin käyttöön puhdasviljemänäytteet yhteensä 28 eri bakteerikannasta (Liite 1, Taulukko 1.). Bakteerit oli suspensoitu suolaliuokseen ja inaktivoitu keittämällä. Näytekoiko oli noin 100-300 µl ja näytteiden OD600-arvo vaihteli välillä 0,122-2,871. ArcDia Oy:ltä saatiin myös Strep. A - positiivinen kontrolli, joka toimitettiin pakastekuivattuna ja suspensoitiin veteen. Puhdasviljemänäytteet ja veteen suspensoitu positiivinen kontrolli säilytettiin -80 °C pakkasessa 50-100 µl näytteiksi jaettuna.

Taulukko 1. Opinnäytetyössä tutkitut bakteerikannat

Laji	ATCC/Kanta no	OD600
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	1,566
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC 9809	1,110
<i>Streptococcus mitis</i>	-	1,684
<i>Streptococcus mutans</i>	-	1,123
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	0,151
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	0,122
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	2,871
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	2,119
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247	1,891
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC 7901	1,024

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin näytteitä *S. agalactia*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. sanguinis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* ja *H. parainfluenzae* (Taulukko 1.). Kaikille bakteerikannoille ei ollut annettu tarkkaa ATCC- tai kannan numeroa.

3.1.2 Näytteiden käsittely

Bakteeripuhdasviljelmistä haluttiin eristää kunkin bakteerin genominen DNA käytettäväksi PCR-reaktioiden kontrollinäytteinä. DNA-eristykseen käytettiin aina 50 µl suuruista näytettä kustakin bakteeripuhdasviljelmäsuspenziosta.

3.1.2.1 Fenoli-kloroformi-uuttomenetelmät

DNA:n eristäminen bakteeripuhdasviljelmistä haluttiin toteuttaa fenoli-kloroformiuutolla. Eristysmenetelmästä kokeiltiin kahta erilaista versiota, joiden työohjeet ovat liitteenä (Liite 2). Työohje I:n mukaisella eristyksellä yritettiin ensin eristää DNA *S. pyogenes* ja *S. mutans* -bakteeripuhdasviljelmästä. Ohjeen vaiheessa 5 kerätty supernatantti jaettiin kahteen putkeen, jotta putkiin mahtui lisättävä 2 vol etanolia. Ohjeen vaiheen 6 saostuksessa syntyi paljon valkoista, kovaa sakkaa, joka ei liuennut kokonaan, vaikka liuotusta jatkettiin ohjeesta poiketen viikonlopun yli. DNA:n pitoisuus ja puhtaus mitattiin näytteestä NanoDropilla (Taulukko 2.).

Taulukko 2. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje I; *S. pyogenes* ja *S. mutans*.

Näyte	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
<i>S. mutans</i> , putki 1	5,90	0,118	0,034	3,42	0,03
	5,37	0,107	0,001	102,36	0,03
	6,11	0,122	0,050	2,44	0,03
<i>S. mutans</i> , putki 2	5,66	0,113	0,005	21,28	0,03
	6,44	0,129	0,047	2,75	0,03
	6,84	0,137	0,053	2,57	0,03
<i>S. pyogenes</i> , putki 1	2,45	0,049	-0,004	-13,99	0,02
	4,31	0,086	0,020	4,22	0,03
	4,30	0,086	0,021	4,08	0,03
<i>S. pyogenes</i> , putki 2	7,33	0,147	0,022	6,56	0,03
	7,33	0,147	0,026	5,71	0,03
	7,23	0,145	0,024	5,98	0,03

NanoDropilla saaduista tuloksista nähtiin, että pitoisuus liuoksessa oli hyvin pieni, ja koska puhtausarvot (A260/280) heittelivät hyvin voimakkaasti, todettiin uuton epäonnistuneen.

Tämän jälkeen menetelmän toimivuus päätettiin varmistaa eristämällä DNA:ta *Escherichia coli* -bakteerisolusta. Puhdasviljelmän kasvatusmaljalta siirrettiin silmukallinen bakteerimassaa 10 ml:aan THG-lientä (1 litrassa 5 g tryptonia, 2,5 g hiivauutetta, 1 g glukoosia, 1000 ml Milli-Q H₂O). Suspensio siirrettiin 37 °C lämpökaappiin, jossa sitä viljeltiin yön yli. Seuraavana päivänä viljelmästä mitattiin OD600, joka oli 1,719. Tämä OD-arvo vastasi hyvin bakteeripuhdasviljelmäsuspensioiden OD-arvoja. Bakteerisuspensiosta jaettiin eppendorf-putkiin muutamia 50-100 µl eriä, jotka siirrettiin -80 °C pakkaseen. DNA:n eristystä varten sulatettiin 2 kpl 50 µl näytteitä. Eristys suoritettiin *E. coli* -suspensiosta samalla tavalla, kuin aiemmin, mutta vaiheen 6 liuotusta jatkettiin tällä kerralla vain yön yli.

Taulukko 3. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje I; *E. coli*.

Näyte	ng/ul	A260	A280	260/280
<i>E. coli</i> , näyte 1, putki 1	12,11	0,242	0,090	2,70
	12,69	0,254	0,098	2,60
	12,91	0,258	0,103	2,51
<i>E. coli</i> , näyte 1, putki 2	11,36	0,227	0,100	2,28
	12,57	0,251	0,126	2,00
	12,91	0,258	0,133	1,94
<i>E. coli</i> , näyte 2, putki 1	12,91	0,258	0,115	2,25
	12,34	0,247	0,115	2,15
	12,41	0,248	0,105	2,35
<i>E. coli</i> , näyte 2, putki 2	15,66	0,313	0,161	1,94
	16,14	0,323	0,167	1,94
	29,83	0,597	0,373	1,60

DNA:n pitoisuus ja puhtaus mitattiin NanoDrop:illa (Taulukko 3). Vaikka pitoisuudet jäivätkin alhaisiksi, puhtausarvot osoittivat, että menetelmällä oltiin saatu eristettyä DNA:ta, eli menetelmä toimi. Tuloksen perusteella DNA:n eristystä yritettiin samalla menetelmällä uudelleen *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mitis* ja *S. sanguinis* -näytteillä. Eristyksen jälkeen DNA-pitoisuudet ja puhtaudet mitattiin NanoDropilla (Taulukko 4).

Taulukko 4. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje I; *S. mitis*, *S. bovis*, *S. agalactiae*, *S. sanguinis*, *S. mutans* ja *S. pyogenes*.

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280
mitis	11,26	0,225	0,043	5,19
	11,34	0,227	0,055	4,15
	11,83	0,237	0,057	4,18
bovis	19,32	0,386	0,053	7,28
	20,89	0,418	0,104	4,03
	18,89	0,378	0,057	6,62
agalactiae	8,80	0,176	0,015	11,41
	9,11	0,182	0,011	16,92
	9,08	0,182	0,002	87,40
sanguinis	7,78	0,156	0,026	5,90
	8,42	0,168	0,038	4,44
	6,70	0,134	0,003	39,76
mutans	14,92	0,298	0,068	4,38
	14,17	0,283	0,063	4,49
	15,05	0,301	0,063	4,78
pyogenes	15,19	0,304	0,036	8,37
	14,02	0,280	0,008	35,73
	15,51	0,310	0,036	8,57

NanoDrop-mittausten perusteella eristyksen saanto oli jälleen huono, minkä lisäksi puhtausarvot olivat aivan liian korkeita, jotta olisi voitu sanoa NanoDropin osoittaman pitoisuuden olleen DNA:ta. Tämän tuloksen perusteella päätettiin kokeilla uutta työohjetta fenoli-kloroformiuuton suorittamiseksi.

Työohje II:n mukaan eristettäväksi valittiin 50 µl näytteet *S. aureus* ja Str A positiivinen kontrolli -suspensioista. Ennen aloittamista näytteet laimennettiin 500 µl tilavuuteen Milli-Q-vedellä. Eristyksen jälkeen pitoisuudet ja puhtaudet mitattiin NanoDropilla, kummastakin putkesta suoritettiin viisi peräkkäistä mittausta (Taulukko 5).

Taulukko 5. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, Työohje II; Str A positiivinen kontrolli ja *S. aureus*

Näyte	ng/μl	A260	A280	260/280
Str A positiivinen kontrolli	10,15	0,203	0,208	0,97
	153,98	3,080	2,294	1,34
	108,45	2,169	1,612	1,35
	10,02	0,200	0,206	0,97
	10,06	0,201	0,192	1,05
<i>S. aureus</i>	50,43	1,009	0,605	1,67
	52,37	1,047	0,642	1,63
	51,80	1,036	0,624	1,66
	51,82	1,036	0,619	1,67
	51,71	1,034	0,621	1,67

NanoDropilla saaduista tuloksista voitiin päätellä, että eristysmenetelmä toimi, sillä *S. aureus* -näytteessä DNA-pitoisuus oli hyvä, ja puhtausarvo hyväksyttävissä rajoissa. Kuitenkaan Str A positiivisesta kontrollista DNA:n eristys ei ollut onnistunut (iso heitto pitoisuuden mittaustuloksissa, liian alhainen 260/280-arvo). Tämän perusteella pääteltiin, että entsyymikäsittely yksinään ei riittänyt hajottamaan streptokokkisoluja, vaan entsyymien toiminnan tehostamiseksi solukalvojen hajottamiseen pitäisi käyttää myös mekaanisia menetelmiä.

Koska entsymaattinen solujen hajotus yksinään ei tuottanut haluttua tulosta, solujen hajotusta tehostettiin sonikoinnilla. 50 μl näytteet *S. bovis* ja Str A positiivinen kontrolli -suspensioista laimennettiin ensin 500 μl tilavuuteen Milli-Q-vedellä, jonka jälkeen näytteitä sonikoitiin 3 minuuttia pulssilla 1 sekunti päällä – 5 sekuntia pois päältä. Sonikoinnin jälkeen näytteet siirrettiin -80 °C pakkaseen odottamaan yön yli. Pakastamisen toivottiin lisäävän solukalvoihin kohdistuvaa mekaanista rasitusta ja siten osaltaan edistävän DNA:n vapautumista suspensioon.

Fenoli-kloroformiuuttomenetelmän alkuun lisättiin vaihe, jossa sulaneisiin solususpensioihin lisättiin ensin 5 μl 1 M Tris (pH 8,0), jolloin näytteiden Tris-pitoisuudeksi tuli n. 10 mM. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin lysotsyymiä (20 mg/ml) niin, että niiden lysotsyymipitoisuudeksi tuli n. 5 mg/ml (lisättiin 167 μl). Näytteet siirrettiin 37 °C lämpöblokkiin 30 minuutiksi. Tämän jälkeen näytteisiin

lisättiin 5,7 µl 20 mg/µl proteinaasi K:ta ja näytteitä inkuboitui 65 °C lämpöblokillä 15 minuuttia. DNA:n eristys suoritettiin loppuun työohje II:n mukaisesti kohdasta 3 alkaen. Kohdassa 6 kerätty yläfaasi jaettiin kahteen putkeen. Näytteistä mitattiin NanoDropilla DNA:n pitoisuus ja puhtaus (Taulukko 6)

Taulukko 6. Fenoli-kloroformiuuton tulokset, sonikoidut näytteet; Str A positiivinen kontrolli, *S. bovis*

Näyte	ng/µl	A260	A280	260/280
Str A positiivinen kontrolli, putki 1	15,27	0,305	0,314	0,97
	15,31	0,306	0,311	0,99
	15,65	0,313	0,294	1,06
Str A positiivinen kontrolli, putki 2	18,66	0,373	0,368	1,02
	19,42	0,388	0,386	1,01
	19,52	0,390	0,370	1,05
<i>S. bovis</i> , putki 1	27,47	0,549	0,433	1,27
	26,49	0,530	0,432	1,23
	26,88	0,538	0,439	1,23
<i>S. bovis</i> , putki 2	17,73	0,355	0,274	1,29
	18,48	0,370	0,292	1,27
	18,71	0,374	0,299	1,25

Näytteiden puhtausarvot jäivät jälleen liian alhaisiksi, joten pääteltiin, ettei sonikoinnilla ollut ollut haluttua vaikutusta DNA:n eristykseen. Fenoli-kloroformimenetelmän käytöstä luovuttiin.

3.1.2.2 Lämpökäsittely

PCR-reaktion kannalta tärkeää on, että DNA on vapautunut soluista liuokseen. Näyte-DNA:n puhtaus puolestaan ei ole PCR-reaktion kannalta ehdottoman tärkeää, joten PCR-reaktiot on mahdollista suorittaa myös suoraan suspensiosta.¹⁰

Lämpökäsittelyä varten 50 µl näytteet *Streptococcus pyogenes* ja Str. A positiivinen kontrolli -solususpensioista siirrettiin -20 °C pakkaseen. Solut päätettiin hajottaa lämpökäsittelyllä sulattamalla -20 °C:ssa yön yli säilytetty solususpensio ja lämmittämällä se sitten lähelle kiehumispistettä. Näytteet

jäähdytettiin, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin solujäänteiden erottamiseksi. Supernatanteista suoritettiin PCR-ajo, mutta näytteet tuottivat negatiivisen tuloksen, joten menetelmä ei ollut onnistunut.

3.1.2.3 PrepMan[®] Ultra -käsittelyt

Kokeilluista näytteiden käsittelymenetelmistä parhaaksi osoittautui käsittely PrepMan[®] Ultra -näytteenkäsittelyreagenssilla (Applied Biosystems[™]). Työ aloitettiin sulattamalla 50 µl näytteet tutkittavista puhdasviljelmänäytteistä (*S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. sanguinis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *H. influenzae* ja *H. parainfluenzae*, Str. A positiivinen kontrolli). Sulaneita suspensioita sentrifugoitiin Sigma 6K15 sentrifugilla +4 °C:ssa 11 000 x g voimalla 15 minuuttia solujen pellettoimiseksi. *S. sanguinis*, *S. pyogenes* ja Str. A positiivinen kontrolli -näytteistä ei muodostunut kunnollista solupellettiä, joten kyseisiä näytteitä sentrifugoitiin samoilla asetuksilla vielä viiden minuutin ajan. Putkissa ei kuitenkaan vielä toisen sentrifugoinnin jälkeenkään näkynyt kunnollista solupellettiä. Tästä huolimatta työskentelyä jatkettiin kaikkien näyteputkien kanssa samalla tavalla. Supernatantti poistettiin putkista mahdollisimman tarkasti, ja siirrettiin uusiin, puhtaisiin eppendorf-putkiin. Supernatantit siirrettiin -80 °C pakkaseen odottamaan.

Tämän jälkeen solut suspensoitiin uudelleen 50 µl:aan PrepMan[®] Ultra -reagenssia. Laboratorion lämpöblokkien oli todettu toimivan epävarmasti, joten suspensiot päätettiin lämmittää PCR-laitteessa. Suspensiot siirrettiin 500 µl PCR-putkiin, putket lämmitettiin 95 °C:een 10 minuutiksi, jonka jälkeen näytteet jäähdytettiin huoneen lämpöiseksi. Näytteiden jäähdyttyä ne siirrettiin uusiin 1,5 ml eppendorf-putkiin.

Näytteitä sentrifugoitiin Sigma 6K15 sentrifugilla huoneenlämmössä 2 minuuttia 16 000 x g voimalla. Sentrifugoinnin jälkeen näytteiden pinnasta kerättiin 25 µl supernatanttia uusiin eppendorf-putkiin. Näin valmistettuja näytteitä säilytettiin jääkaapissa +4 °C:ssa.

3.1.3 PCR-näytteiden valitseminen

NanoDrop ND1000 -spektrofotometrillä mitattiin DNA:n pitoisuus ja puhtaus sekä PrepMan® Ultra -reagenssilla käsitellyistä näytteistä (Liite 3, taulukko 1.) sekä ennen käsittelyä kerätyistä solususpensioiden supernatanteista (Liite 3, taulukko 2.). Kustakin näytteestä tehtiin kolme mittausta, joiden keskiarvojen perusteella valittiin PCR:ään sopiva näyte (Taulukko 2.).

Taulukko 7. NanoDrop-mittausten tulosten keskiarvot.

Näyte	Käsittely	Pitoisuus (ng/μl, avg)	A260/280 (avg)
<i>S. agalactiae</i>	PrepMan Ultra	27,85	2,03
	Supernatantti	36,27	1,85
<i>S. Bovis</i>	PrepMan Ultra	12,27	1,75
	Supernatantti	52,80	1,37
<i>S. Mitis</i>	PrepMan Ultra	69,91	2,18
	Supernatantti	120,15	2,03
<i>S. Mutans</i>	PrepMan Ultra	9,73	1,61
	Supernatantti	17,20	1,79
<i>S. Pyogenes</i>	PrepMan Ultra	11,38	2,21
	Supernatantti	22,90	1,76
<i>S. Sanguinis</i>	PrepMan Ultra	4,11	5,22
	Supernatantti	31,22	1,90
<i>Str. A pos. Kontr.</i>	PrepMan Ultra	4,09	5,07
	Supernatantti	-17,48	1,03
<i>H. Influenzae</i>	PrepMan Ultra	40,33	2,08
	Supernatantti	42,54	2,20
<i>H. Parainfluenzae</i>	PrepMan Ultra	44,85	2,00
	Supernatantti	141,99	2,21
<i>S. Aureus</i>	PrepMan Ultra	51,74	2,02
	Supernatantti	92,74	2,08
<i>S. Epidermidis</i>	PrepMan Ultra	14,94	1,63
	Supernatantti	37,15	2,24

Tuloksista pääteltiin, että solujen inaktivointi ennen Molekyylidiagnostiikan laboratorioon tuomista oli todennäköisesti rikkonut bakteerien solukalvot ja vapauttanut DNA:n soluista, jolloin fenoli-kloroformiuuttojen yhteydessä suurin osa DNA:sta ei ollutkaan ollut solupelletissä, vaan mennyt supernatantin mukana jätteesen. Koska suoraan suspensiosta tehty PCR-kokeilu (katso kappale 3.1.2.2) ei kuitenkaan ollut tuottanut positiivista tulosta, päätettiin soluista itsestään peräisin olevien PCR-inhibiittorien vaikutuksen mahdollisuus eliminoida käyttämällä PCR:ään PrepMan Ultralla käsiteltyjä näytteitä.

3.2 Alukkeiden ja koettimien sopivuuden tarkistus

Reaktiota varten suunnitteilla olleen spesifisemmän koettimen (GCTTGCAGAAGGCGTTGCGGTTGCTGATGACAT, Liite 4) sopivuuden tarkistukseen käytettiin internetissä vapaasti saatavilla olevia BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ja Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) -rinnastustyökaluilla.

BLAST®-työkalulla rinnastettiin *Streptococcus pyogenes*en Manfredo-kannan ptsI-geenin sekvenssi lähisukuisten bakteerien genomeihin. Rinnastuksiin löydettyt lajit (kannat lajin nimen perässä suluissa) olivat *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* (ATCC 12394, GGS_124), *Streptococcus mutans* (UA159), *Streptococcus pneumoniae* (AP200), *Streptococcus mitis* (ATCC 6249) ja *Streptococcus mitis* (B6). Genomien rinnastuksen jälkeen etsittiin *S. pyogenes* -sekvenssistä koettimen sekvenssi ja etsittiin koettimen alueelle osuvat erot sekvensseissä. Vähiten eroja sekvenssien välillä koettimen kohdalla oli *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* -sekvensseissä, joissa eroavia nukleotideja koettimen alueella oli vain neljä (Liite 5). Koetin todettiin kuitenkin käyttöön soveltuvaksi.

Eri *S. pyogenes*-kantojen ptsI-geenien sekvenssejä verrattiin myös toisiinsa. Rinnastus tehtiin Clustal Omega -työkalulla (Liite 6). Rinnastuksesta etsittiin kohdat, joissa genomeissa oli nukleotidieroja. Tämän jälkeen sekvensseistä etsittiin sekä nykyisen lyhyen koettimen, että suunnitellun pitkän koettimen sekvenssit, ja tarkistettiin, ettei eroavaisuuksia osu koetinten alueille. Molemmat koettimet todettiin toimiviksi.

Myös alukkeita ja koettimia vertailtiin keskenään, jotta varmistuttiin siitä, etteivät alukkeet muodostaisi keskenään tai koettimen kanssa epätoivottuja hybridisaatiotuotteita.

3.3 qPCR:n testaus

Reaaliaikaisen PCR:n toimintaa valituilla alukkeilla kokeiltiin ensin SYBR green -menetelmällä, jonka jälkeen siirryttiin kokeilemaan valitun koettimen toimintaa ja eri bakteerilajien ristireagointia PCR:ssä. Positiivisen tuloksen toteamiseksi vähintään kahden kolmesta samasta näytteestä tehdystä rinnakkaisesta näytekupasta tuli tuottaa positiivinen tulos. Positiivisia olivat tulokset, joiden CT-arvo oli pienempi kuin 40, ja vahvasti positiivisia olivat tulokset, joiden CT-arvo oli pienempi kuin 35.

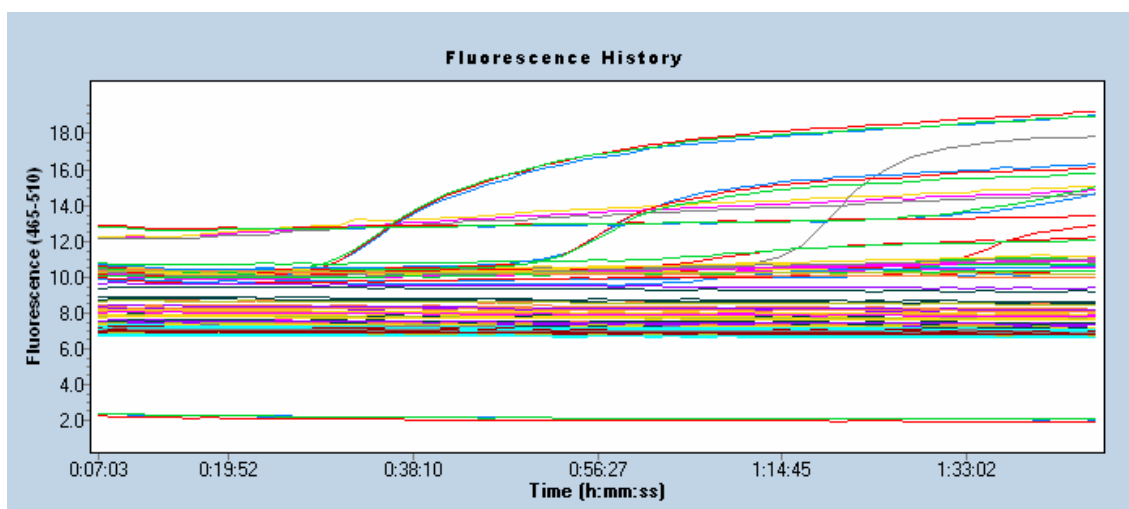
3.3.1 SYBR green -testi

Alukkeiden toimivuus tarkistettiin suorittamalla qPCR-ajo SYBR-green reagenssilla. Näytteiksi valittiin fenoli-kloroformi-uutetut Str. A positiivinen kontrolli ja *Staphylococcus aureus* -näytteet (Taulukko 4). Positiiviseksi kontrolliksi valittiin aiemmissa ajoissa selkeästi positiivinen ArcDian näyte numero 49. Ajossa reagenssina käytettiin Roche Applied Sciencen LightCycler® 480 SYBR Green I Master -kittiä, joka sisältää SYBR Green I Master reagenssin lisäksi PCR-laatuista vettä, jota käytettiin kaikissa työvaiheissa. Työohje liitteenä (Liite 7). SYBR-green-testiajo ei tuottanut toivottua tulosta, sillä edes aiemmin selkeästi positiivisiksi todetut kontrollinäytteet eivät tuottaneet positiivista tulosta. Negatiivisesta tuloksesta huolimatta päätettiin kokeilla PCR:ää koettimen kanssa, sillä samoilla reagensseilla suoritetuista ajoista oli aiemmin saatu johdonmukaisia tuloksia. Ajon ohjelmoinnissa oli virhe; Ohjelman Melting Curve-osiossa näytettä pidettiin 65 °C lämpötilassa 1 sekunti yhden minuutin sijaan. Virhe ei kuitenkaan ollut PCR-tuotteen amplifioitumisen kannalta oleellinen, joten ajon epäonnistuminen ei ole selitettävissä tämän ohjelmointivirheen perusteella. Muita virheitä ei tästä ajosta saatu paikallistettua.

3.3.2 Probes master -ajot

Kun alukkeet oli todettu reaktiossa toimiviksi, aloitettiin qPCR-testit koetinta käyttäen. Ajossa reagenssina käytettiin Roche Applied Sciencen LightCycler® 480 Probes Master -kittiä, joka SYBR green -kitin tavoin sisältää Probes Master -reagenssin ja PCR-laatuisen veden, jota käytettiin kaikissa työvaiheissa. Työohje liitteenä (Liite 8).

Ensimmäiseen testiajioon näytteiksi valittiin lämpösokkikäsitellyt *Streptococcus pyogenes* ja Str. A positiivinen kontrolli (katso kappale 3.1.2.2), fenoli-kloroformi-uutettu *Staphylococcus aureus* (Taulukko 4) sekä pakkasesta sulatetut vanhat näytteet *Streptococcus mitis* ja ArcDia ATCC 19615. Negatiivisiksi kontrollinäytteiksi valittiin aiemmin negatiivisen tuloksen tuottaneet ArcDia 19, ja ArcDia 27, ja positiiviseksi kontrolliksi aiemmin positiivisen tuloksen tuottanut ArcDia 57K.



Kuva 4. Ensimmäisen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaaja.

Selkeästi negatiivisiksi (kaikista kuopista negatiivinen tulos) jäivät näytteet ArcDia 27 ja ArcDia ATCC 19615. Selkeästi negatiivinen oli myös *S. pyogenes* -näyte, jossa yhdessä näytekupassa syntyi PCR-tuotetta, mutta CT-arvo oli huomattavasti suurempi kuin 40. Jotta tulos voidaan todeta positiiviseksi, tulee vähintään kahden kolmesta rinnakkaisesta näytekupasta tuottaa positiivinen

tulos. Tämän perusteella myös näytteet *S. pyogenes*, ja *S. aureus* jäivät negatiivisiksi. Positiiviseksi kontrolliksi valittu ArcDia 54 K, *Streptococcus mitis* ja yllättäen myös aiemmin negatiiviseksi todettu ArcDia 19 puolestaan antoivat positiivisen tuloksen (Kuva 4.). Koska sekä positiivinen kontrolli että negatiivisen kontrollit (NPC, NTC, NC) tuottivat odotetun tuloksen, voitiin PCR-ajo todeta onnistuneeksi.

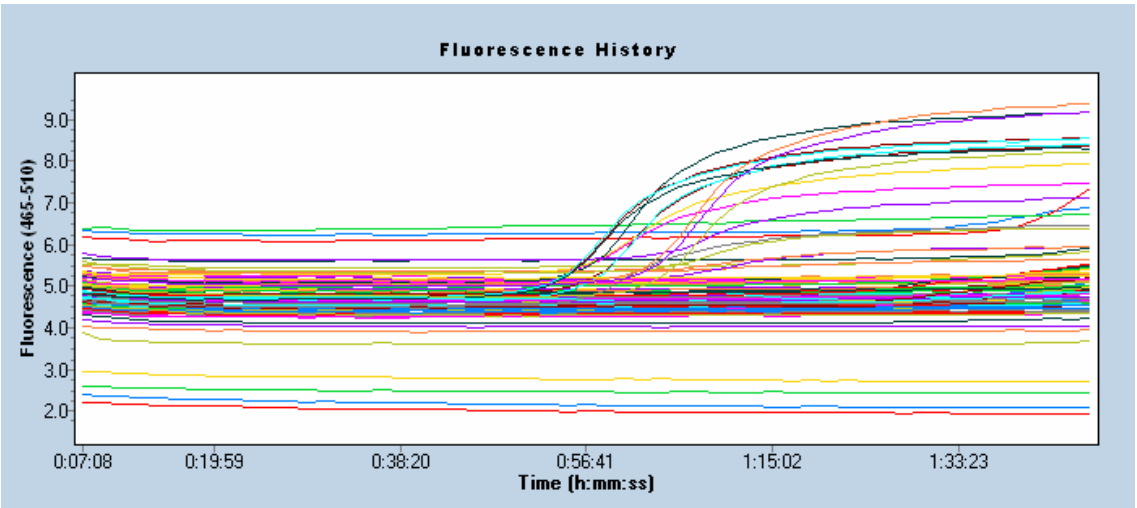
Taulukko 8. Ensimmäisen koettimellisen testiajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.

Näyte	CT
Str. A positiivinen kontrolli	-
	39,64
	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	37,77
	-
<i>Streptococcus mitis</i>	12,91
	12,92
	13,03
ArcDia 19	31,15
	30,5
	-
ArcDia 54K	25,22
	25,07
	25,04

Taulukkoon (Taulukko 8.) on koottu kaikki näytteet, joissa yksikin näytekupista oli positiivinen. Näistä virallisesti negatiivisia olivat *S. pyogenes*, Str. A positiivinen kontrolli ja *S. aureus*.

Toisen testiajon näytteinä käytettiin pakkasessa säilytettyjä vanhoja näytteitä. Näytteiksi valittiin *Streptococcus anginosus* kannat 209, 1019, 3113, 3387, 4015, 5011, 7561 ja 7765, *Streptococcus constellatus* kannat 3792, 5690 ja 5691, ja *Streptococcus intermedius* kannat 1343, 5380, 5643, 6194 ja 6418, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus bovis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, 29 Str B, 34 Str C, 37 Str G ja 36 Str G. Positiivisiksi kontrolleiksi valittiin ArcDian näytteet 49 ja 54 ja

negatiiviseksi kontrolliksi ArcDia ATCC 19615, joka edellisessä testissä oli selkeästi negatiivinen.



Kuva 5. Toisen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaaja.

Selkeästi negatiivisiksi (kaikki kolme rinnakkaista kuoppaa negatiivisia tai positiivisia kuoppia vasta 40. syklin jälkeen) jäivät kaikki *S. anginosus* -kannat, kaikki *S. constellatus* -kannat, kaikki *S. intermedius* -kannat, *S. agalactiae*, *S. epidermidis*, *S. bovis*, *H. influenzae* ja *H. parainfluenzae*. 29 Str B -näytteen kuopista yksi antoi positiivisen tuloksen, mutta näyte todettiin negatiiviseksi. Selkeästi positiivisen tuloksen antoivat 34 Str C, 36 Str G ja 37 Str G -näytteet. Positiiviset kontrollit 49 ja 54 olivat selkeästi positiivisia, ja negatiiviset kontrollit selkeästi negatiivisia (Kuva 5.).

Taulukko 9. Toisen koettimellisen testiajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.

Näyte	CT
29 Str B	-
	32,61
	-
34 Str C	27,27
	27,01
	27,56

(jatkuu)

Taulukko 9 (jatkuu).

37 Str G		27,65
		27,52
		27,56
36 Str G		32,32
		31,57
		31,57
54		26,01
		25,82
		25,86
49		30,71
		30,97
		30,95

Taulukkoon (Taulukko 9.) on koottu kaikki näytteet, joissa yksikin näytekuopista oli positiivinen. Näistä negatiiviseksi tulkittiin näyte 29 Str B, jossa vain yksi kolmesta näytekuopasta oli positiivinen.

Kolmannessa testiajossa tutkittiin PrepMan® Ultra -reagenssilla käsiteltyjä näytteitä (Taulukko 7). Näytteiksi valittiin *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. bovis*, *S. mitis* ja *S. pyogenes*. Näiden lisäksi testiin sisällytettiin laimennossarja *S. pyogenes* -bakteerisuspension supernatantista (Taulukko 10). Positiivisiksi kontrolleiksi valittiin näytteet 49 ja 54. Joissakin ArcDian näyteputkista oli havaittu pitkän säilytyksen aikana muodostuneen keltaista väriä. Keltaisen värin epäiltiin inhiboivan PCR-reaktiota, jonka vuoksi testiin otettiin mukaan myös toinen 49-näyte, jossa oli selkeästi havaittava keltainen väri.

Taulukko 10. *Streptococcus pyogenes* -laimennossarja.

Laimennos no	Suhde	Pitoisuus ng/μl
0	1/1	23
1	1/5	4,6
2	1/25	0,92
3	1/125	0,18
4	1/625	0,037
5	1/3125	0,0074
6	1/15625	0,0015
7	1/78125	0,00029
8	1/390625	0,000059
9	1/1953125	0,000012
10	1/9765625	0,0000024

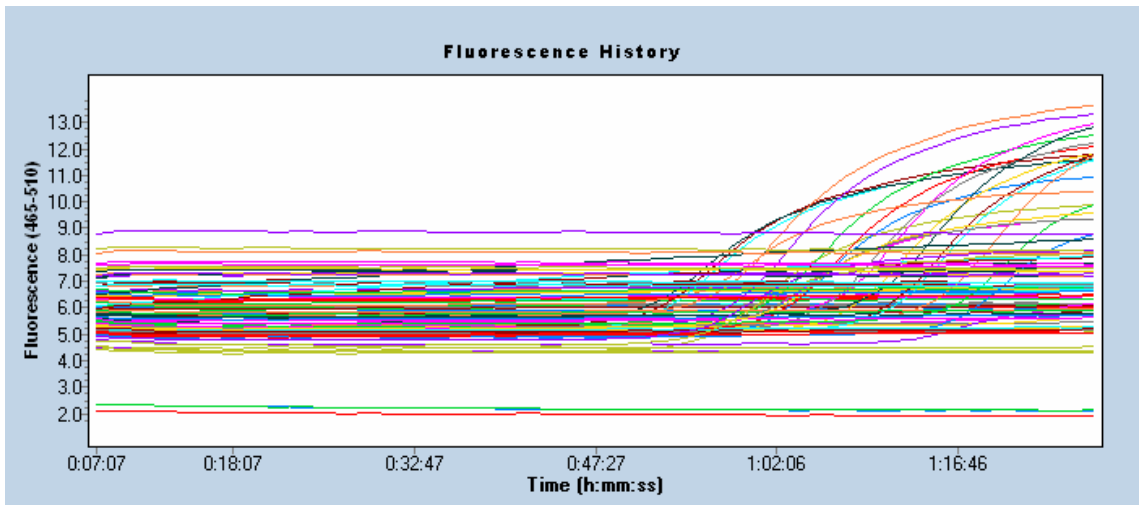
Laimennossarja valmistettiin lisäämällä ensin 2 μl supernatanttia 8 μl:aan Milli-Q-vettä ja siirtämällä sen jälkeen aina 2 μl laimennosputkesta uuteen 8 μl:aan Milli-Q-vettä. Sekoitus vorteksoimalla aina ennen uuden laimennoksen valmistamista.

Tässä ajossa *H. parainfluenzae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. bovis*, *S. mitis* ja PrepMan® Ultralla käsitelty *S. pyogenes* jäivät selkeästi negatiivisiksi. Laimentamaton *S. pyogenes* -supernatantti tuotti myös negatiivisen tuloksen, sillä vain yksi kuoppa tuotti positiivisen tuloksen, sekin hyvin myöhään. *S. pyogenes* supernatantin laimennoksista selkeästi positiivisen tuloksen tuottivat laimennokset 1-5. Laimennokset 6 ja 7 todettiin myös positiivisiksi, koska niissä kaksi kolmesta kuopasta tuotti positiivisen tuloksen (Taulukko 11.).

Taulukko 11. Kolmannen koettimellisen ajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.

Näyte	CT
<i>S. pyogenes</i> supernatantti (laimentamaton)	40,00
	-
	-
<i>S. pyogenes</i> supernatantti 1/5	25,07
	25,09
	24,79
<i>S. pyogenes</i> sup. 1/25	27,86
	28,45
	27,51
<i>S. pyogenes</i> sup. 1/125	30,05
	30,60
	29,83
<i>S. pyogenes</i> sup. 1/625	33,24
	32,22
	33,47
<i>S. pyogenes</i> sup. 1/3125	35,01
	35,28
	34,88
<i>S. pyogenes</i> sup. 1/15625	37,28
	35,85
	-
<i>S. pyogenes</i> sup. 1/78125	37,89
	-
	38,06
49	29,43
	29,49
	29,70
54	26,98
	26,82
	26,86

Positiiviset kontrollit 49 ja 54 olivat selvästi positiivisia ja negatiiviset kontrollit jäivät selvästi negatiivisiksi, joten ajon voitiin todeta onnistuneen. Yllättävää oli, ettei positiivista tulosta saatu laimentamattomasta *S. pyogenes* -supernatantista. Tämä päätettiin ottaa huomioon testin jatkokehityksessä. Myös keltaisen värin vaikutus oli yllättävä. Keltaiseksi värjäytyneen näytteet amplifikaatiokäyrän kuvaaja oli lineaarinen ja fluoresenssi kasvio hitaasti (Kuva 6.). Normaali amplifikaatiokäyrän kuvaaja on eksponentiaalinen (loivasti S-kirjaimen muotoinen).



Kuva 6. Kolmannen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaaja.

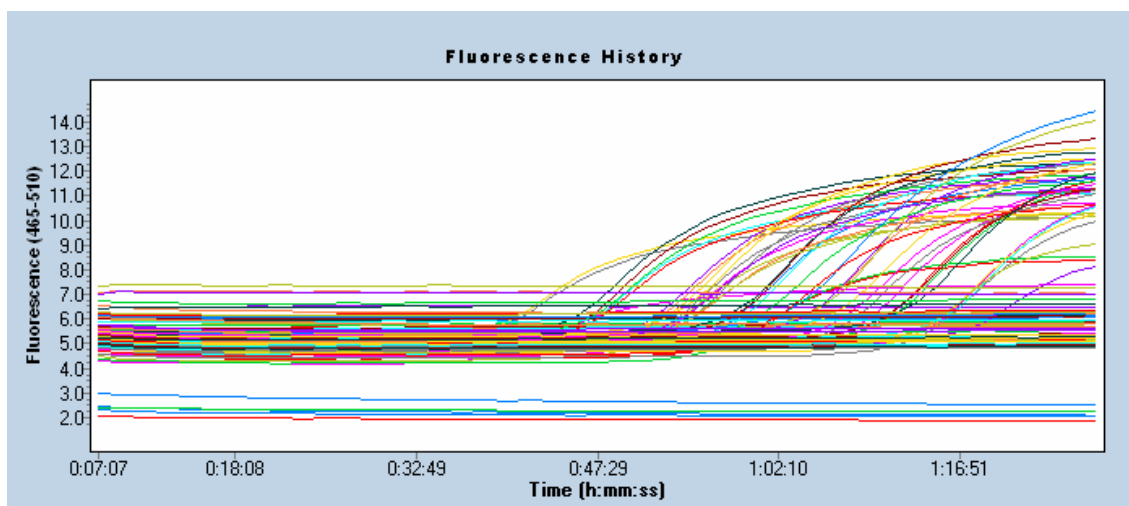
Koska *S. mitis* oli aiemmassa ajossa tuottanut positiivisen tuloksen, päätettiin vielä tutkia sen laimennossarjan käyttäytymistä. Positiiviseksi kontrolliksi valittiin *S. pyogenes* supernatantti ja negatiiviseksi kontrolliksi PrepMan® Ultra -käsitelty *S. aureus*. *S. mitis* -DNA:sta tehtiin kaksi laimennossarjaa: toinen PrepMan® Ultra -käsittelystä näytteestä ja toinen bakteerisuspension supernatantista. Laimennossarjat valmistettiin lisäämällä 1 µl DNA-liuosta 9 µl:aan Milli-Q-vettä ja siirtämällä aina 1 µl laimennosputkesta seuraavaan putkeen, jossa oli 9 µl puhdasta Milli-Q-vettä.

Taulukko 12. *S. mitis*, *S. pyogenes* ja *S. aureus* -laimennossarjat.

Laimennos	Suhde	<i>S. mitis</i> , PrepMan (ng/µl)	<i>S. mitis</i> , super- natantti (ng/µl)	<i>S. pyogenes</i> (ng/µl)	<i>S. aureus</i> (ng/µl)
0	1/1	69,91	120,15	22,9	51,74
1	1/10	6,991	12,015	2,29	5,174
2	1/100	0,6991	1,2015	0,229	0,5174
3	1/1000	0,06991	0,12015	0,0229	0,05174
4	1/10000	0,006991	0,0012015	0,00229	0,005174
5	1/100000	0,0006991	0,00012015	0,000229	0,0005174
6	1/1000000	0,00006991	0,000012015	0,0000229	0,00005174

Ajossa *S. pyogenes* -supernatantin laimennossarja tuotti samanlaisia tuloksia kuin edellisellä kerralla: laimentamaton supernatantinäyte oli selkeästi negatiivinen ja laimennokset 1-4 selkeästi positiivisia. Laimennoksessa 5 kaksi kolmesta näytekupasta oli positiivisia, joten tulos tulkittiin positiiviseksi.

Laimennos 6 oli selkeästi negatiivinen. *S. mitiksen* laimennossarjoista vain supernatantista tehtyä laimennossarjaa voitiin kokonaisuudessaan tulkita luotettavasti, sillä pipetoitaessa näytteitä levyllä tapahtui pipetointivirhe, jossa laimennokset 4-6 pipetoitiin sekaisin. Tässä laimennossarjassa kuitenkin laimentamaton näyte jäi selkeästi negatiiviseksi ja laimennokset 1-3 tuottivat selkeästi positiivisen tuloksen. *S. mitis* -supernatantista tehdyssä laimennossarjassa laimentamaton näyte jäi selkeästi negatiiviseksi. Laimennoksissa 1 ja 5 kaksi kolmesta näytekuopasta tuotti positiivisen tuloksen, joten nämä tulkittiin positiivisiksi. Laimennokset 2-4 ja 6 olivat selkeästi positiivisia. Kaikki *S. aureus* -laimennossarjan näytteet jäivät selvästi negatiivisiksi, joten ajon voitiin todeta onnistuneen (Kuva 7.).



Kuva 7. Neljännen koettimellisen testiajon amplifikaatiokäyrien kuvaajat.

Taulukko 13. Neljännen koettimellisen ajon tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot.

Laimennos	<i>S. mitis</i> , PrepMan (CT)	<i>S. mitis</i> , supernatantti (CT)	<i>S. pyogenes</i> (CT)
1		17,78	-
		17,58	21,46
		17,53	21,60
2		21,11	24,75
		20,99	24,76
		20,98	24,91
3		24,21	28,33
		24,10	28,24
		24,18	28,26
4		27,59	31,62
		27,69	31,57
		27,82	32,27
5		33,56	-
		25,75	34,54
		25,80	34,93
6		tyhjä	36,80
		tyhjä	36,52
		tyhjä	36,56

Taulukkoon (Taulukko 13.) on koottu laimennossarjojen positiivisia tuloksia antaneiden näytteiden CT-arvot. Yliviivatut arvot ovat pipetointivirheen takia hylättyjä.

4 TULOKSET

4.1 Testin spesifisyys

Alukkeet, joita PRC-reaktioissa käytettiin (TJTrev ja GEPTsIF234) toimivat hyvin, ja PCR-reaktio tuotti johdonmukaisesti positiivisen tuloksen niistä näytteistä, joiden ennestään tiedettiin sisältävän *Streptococcus pyogenes*-DNA:ta. Kun PCR-ajoihin otettiin mukaan testissä käytettäväksi valittu lyhyt Universal ProbeLibrary -koetin (Probe #74), todettiin testin tuottavan positiivisen tuloksen *S. pyogenes* -DNA:sta, mutta myös *Streptococcus mitis* -DNA:sta. Tämä tulos kertoo, ettei testi ole tällä koettimella spesifinen *S. pyogenes* -DNA:lle, vaan *S. mitis* ristireagoi testissä tuottaen vääriä positiivisia tuloksia.

4.2 Testin tarkkuus

NanoDropilla tehtyjen mittausten perusteella *Streptococcus pyogenes* -solususpension supernatantissa DNA:n pitoisuus oli noin 23 ng/μl. Laimennossarjasta tehdyn qPCR-ajon (katso kappale 3.3.2) tulosten mukaan ensimmäinen positiivinen tulos saatiin laimennoksella 1/5 (sarjan ensimmäinen laimennos), jonka laskettu pitoisuus oli noin 4,6 ng/μl ja viimeinen positiivinen tulos laimennoksella 1/78125 (sarjan seitsemäs laimennos), jonka laskettu pitoisuus oli noin 0,00029 ng/μl, eli 290 fg/μl. Positiivisen tuloksen kriteerejä olivat, että vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisesta laimennoksesta tuotti positiivisen tuloksen, ja että näytteen CT-arvo oli korkeintaan 40. Näytettä pipetoitiin kuhunkin näytekuoppaan 2,5 μl, joten DNA:n alkumäärä kuopassa oli noin 725 fg.

S. pyogenes -bakteerin genomi on 1 852 442 emäsparia pitkä¹⁷. Yhden emäsparin paino on keskimäärin 660 daltonia. Näin ollen yhden genomien paino on $660 \text{ Da} \times 1\,852\,442 = 1\,222\,611\,720 \text{ Da}$. Yksi dalton on SI-yksiköksi munnnettuna $1,66053892173 \times 10^{-9} \text{ fg}$. Yksi *S. pyogenes* -genomi painaa siis noin 2,03 fg. Kun plasmidi-DNA:n määrää ei huomioida, pienin havaittava

bakteerimäärä (genomien määrä) on tällä koettimella (Roche, Universal Probe Library, Probe #74) 357 bakteeria näytekuoppaa kohden. *S. pyogenes* -bakteerin läsnäolo voidaan siis varmasti todeta näytteestä, jossa *S. pyogenes* -bakteereja on 142 800 millilitrassa. Terveen ihmisen yhdessä sylkimillilitrassa bakteereja on 10 000 000.¹⁸

5 PÄÄTELMÄT

5.1 Ristireagoivat lajit ja PCR-inhibiittorit

Kaikkia ArcDia:lta saatuja bakteeripuhdasviljelmiä ei ehditty tutkia, joten ristireagoivia lajeja tai kantoja saattaa löytyä vielä lisää. Testin jatkokehitys vaatii siis puhdasviljelmänäytteiden laajempaa tutkimista. Myös vanhoihin näytteisiin syntynyt PCR-reaktiota inhihoiva keltainen väriaine vaatii lisää tutkimista, sillä se vaikuttaa näytteiden säilyvyyteen ja siten mahdollisesti tarvittavien testien toistamisten onnistumiseen.

5.2 Spesifisyys

Testin tuloksen perusteella on perusteltua parantaa testin spesifisyyttä käyttämällä testissä pidempää, *Streptococcus pyogenes* -DNA:lle spesifiseksi suunniteltua koetinta. Uusien alukkeiden valitseminen niin, että kohdealue bakteerin genomissa on lyhyempi voi puolestaan parantaa testin herkkyyttä.

5.3 Tarkkuus ja kvantitatiivisuus

Testi on vielä hyvin epätarkka verrattuna validoitavaan MariPOC-testijärjestelmään, jolla positiivinen tulos voidaan todeta näytteestä, jossa kohdebakteereja on 5 000 kappaletta millilitrassa (500 CFU). Spesifisemmän koettimen käyttö saattaisi parantaa testin tarkkuutta.

Testin tarkkuus on riippuvainen näytteen DNA-pitoisuuden määrittämiseen käytettävän menetelmän herkkyydestä. DNA-pitoisuuden määrittäminen spektrofotometrisesti NanoDropilla on epätarkka menetelmä, jonka tarkkuus kärsii huomattavasti tutkittaessa näytteitä, joiden DNA-pitoisuus on alle 20 ng/μl. Testin tarkkuuden laskennallinen määrittäminen NanoDropilla saatujen tulosten perusteella onkin vain suuntaa-antavaa, eikä näin voida virallisesti selvittää kohde-DNA:n määrää näytteessä.¹⁹ DNA-määrän laskennallista

määrittämistä voidaan käyttää tutkimustulosten kannalta luotettavasti vain, jos positiivisen näytteen DNA-pitoisuuden määrittämiseen käytetään tarkempaa mittaussmenetelmää ennen laimennossarjan valmistusta.

DNA:n pitoisuuden tarkempaan määrittämiseen voidaan käyttää fluorometriä menetelmiä, jotka perustuvat kaksijuosteiseen DNA:han kiinnittyvien fluoresoivien merkkiaineiden käyttöön. Esimerkiksi Invitrogenin Quant-iT™ PicoGreen®-reagenssilla voidaan määrittää DNA-pitoisuus näytteistä, joiden pitoisuus on niinkin pieni, kuin 25 pg/ml. Kun väriaine sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han, fluoresenssin määrä reaktioseoksessa kasvaa huomattavasti. Näytteen fluoresenssia verrataan referenssi-DNA:sta (esimerkiksi calf thymus) valmistettuun standardisuoraan.¹⁹

5.4 Positiivinen kontrollitemplaatti ja sisäinen kontrollitemplaatti

DNA:n kvantifioimiseksi testiin tarvitaan positiivinen kontrollitemplaatti, jonka sekvenssi on koettimen kanssa yhteensopiva. Positiivisesta kontrollitemplaattista valmistetun laimennossarjan perusteella voidaan määrittää testille standardisuora, joka mahdollistaa kohde-DNA:n kvantitatiivisen määrittämisen.

Sisäisen kontrollitemplaatin sekvenssi on sama kuin kohde-DNA:n, mutta koettimen kiinnittymisalue on vaihdettu sellaiseksi, että se vastaa käytettävää kontrollitemplaatin koetinta. PCR-reaktioseokseen lisätään pieni määrä sisäistä kontrollitemplaattia ja sitä vastaavaa koetinta ja PCR-ajo suoritetaan yhtäaikaaisesti sekä kontrollille että näytteelle käyttäen samoja alukkeita. Amplifikaatiotuotteen muodostuminen kertoo, että testi toimii oikein, eikä reaktiossa ole PCR-inhibiittoreita, vaikka näytteessä ei olisikaan *Streptococcus pyogenes*-DNA:ta. Näytteessä oleva DNA ja templaatti kilpailevat primereista. Jos näytekupassa havaitaan vain kohde-DNA:n amplifikaatiotuotetta, todetaan näytteessä olleen sitä huomattavan paljon. Sisäistä kontrollitemplaattia käyttämällä voidaan näin ollen todistaa testituloksen olevan aidosti negatiivinen.²⁰

5.5 Kliiniset näytteet

Kun testin toiminta on varmistettu sekä riittävä määrä puhdasviljelmiä tutkittu ja suoritettu vaadittavat toimet ristireagoimisen eliminoimiseksi, pitää testin toiminta varmistaa vielä tutkimalla riittävä määrä kliinisiä nielunäytteitä. Nielunäytteiden tulee olla testattu vähintään kahdella eri testausmenetelmällä (toinen näistä perinteinen nieluviiljely) ennen PCR-testausta, ja PCR:llä saatujen tulosten tulee olla yhteneviä muilla testimenetelmillä saatujen tulosten kanssa, jotta testin voidaan todeta toimivan luotettavasti.

5.6 PCR-testin tuotteistaminen

Vaikka PCR testin tarkkuus onkin vielä heikko verrattuna ArcDian testijärjestelmään, se on nopeudeltaan kuitenkin yhtä tehokkaasti toteutettavissa. Tämän vuoksi testin tuotteistaminen on ajatuksena realistinen, kunhan testin tarkkuuteen ja herkkyyteen liittyvät ongelmat on saatu ratkaistua. Tuotteistamisen kannalta tärkeä haaste on määrittää testin positiivisuudelle raja-arvo, joka kertoo montako DNA-kopiota näytteessä tulee testiajan loputtua olla, jotta näyte voidaan todeta positiiviseksi. PCR-menetelmien ongelma on kuitenkin se, että ristiriitatilanteissa (ristireagoivien lajien esiintyminen näytteessä) tulos on varmennettava sekvensoimalla reaktiotuote. PCR-tekniikalla myös raja-arvotuloksia saadaan usein. Niiden varmentamiseen tulee käyttää jotain toista testimenetelmää.

LÄHTEET

1. ArcDia International Oy Ltd. Viitattu 26.9.2012 <http://arcdia.fi/>.
2. Microbe Wiki. Viitattu 10.10.2012
http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_pyogenes.
3. Brandt, C. M.; Haase, G.; Schnitzler, N.; Zbinden, R. & Lütticken, R. 1999. Characterization of Blood Culture Isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Possessing Lancefield's Group A Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. Dec. 1999, 4194-4197
4. Tiilikainen, A. S.; Vaara, M.; Vaheri, A. 1997. *Lääketieteellinen mikrobiologia*. 8., uudistettu painos, 395-402. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim
5. Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K.; Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*, 153-157. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu
6. Kubista M. et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27 (2006), 95-125
7. Ranki-Pesonen M. 1994. Onko polymaasiketjureaktio käytännön mikrobidiagnostiikkaa? *Lääketieteellinen Aikauskirja Duodecim*, 1994;110(6):615.
8. Bollet C. et al. 1991. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acids Research*, vol 19, no 8, 1955.
9. Rantakakko-Jalava K.; Jalava J. 2002. Optimal DNA Isolation Method for Detection of Bacteria in Clinical Specimens by Broad-Range PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. Nov. 2002, 4211-4217.
10. Jose, JJM; Brahmadathan, KN. 2006. Evaluation of simplified DNA Extraction Methods for emm Typing of Group A Streptococci. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24 (2):127-30.
11. Suomen virtuaaliyliopisto. Solunetti. 2006. Viitattu 24.10.2012.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2/
12. Life Technologies Corporation. 2010. PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent Protocol.
13. Thermo Fischer Scientific Inc. 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's manual.
14. Roche Applied Science. Viitattu 29.10.2012 <https://www.roche-applied-science.com/> > Special Interest Sites > Real-Time PCR > LightCycler[®] 480 System
15. Roche Applied Science. Viitattu 3.11.2012 <https://www.roche-applied-science.com/> > Special Interest Sites > Real-Time PCR > Universal ProbeLibrary System
16. Valasek, M. A.; Repa, J. J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiological Education*. 29: 151-159
17. Ferretti, J. J. et al. 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America*. vol. 98 no. 8 4658-4663
18. Honkala S. 2009. Duodecim Terveyskirjasto. Viitattu. 13.11.2012 <http://terveyskirjasto.fi> > Terveysten edistäminen > Terve Suu > Suun rakenne, hampaiden kehittyminen ja toiminta > Suun bakteerit

19. GenVault 2005. DNA Quantitation: Methods and Recommendations in use at GenVault.
20. Uhl, J. R. et al. 2002. Comparison of LightCycler PCR, Rapid Antigen Immunoassay, and Culture for Detection of Group A Streptococci from Throat Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan 2003, p. 242-249.

ArcDia Internationalan Oy Ltd:n toimittamat puhdasviljelmänäytteet

Näytteet toimitettiin suolaliuossuspensioina. Näytetilavuus oli 100-300 µl ja bakteerit oli inaktivoitu keittämällä.

Taulukko 1. ArcDia Oy:n toimittamat puhdasviljelmänäytteet

Laji	ATCC/Kanta no	OD600	Näytetilavuus n. (µl)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	1,566	300
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC 9809	1,11	300
<i>Streptococcus mitis</i>	-	1,684	300
<i>Streptococcus mutans</i>	-	1,123	300
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	0,151	300
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	0,122	300
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	2,871	300
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	2,119	300
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247	1,891	300
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC 7901	1,024	300
<i>Streptococcus anginosus</i>	Kanta 209	2,388	100
	Kanta 1019	1,174	100
	Kanta 3113	2,574	100
	Kanta 3387	1,421	100
	Kanta 4015	2,29	100
	Kanta 5011	2,337	100
	Kanta 7561	1,158	100
	Kanta 7765	0,951	100
	Kanta 8073	1,938	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	Kanta 3792	0,589	100
	Kanta 5690	2,073	100
	Kanta 5691	2,147	100
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Kanta 1343	0,901	100
	Kanta 5380	1,023	100
	Kanta 5643	0,687	100
	Kanta 6194	1,033	100
	Kanta 6418	1,573	100
	Kanta 7404	0,724	100

Fenoli-kloroformiuuttojen työohjeet

Työohje I

1. Pelletoi solut sentrifugoimalla 10 000 x g voimalla 5 minuuttia. Poista supernatantti ja suspensoi solupelletti uudelleen 0,5 millilitraan 50 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA.
2. Siirrä suspensio -20 °C:een (muutamaksi tunniksi tai yön yli).
3. Lisää 50 µl 250 mM Tris (pH 8.0), 10 mg/ml lysotsyymi jäisen suspension päälle ja anna sulaa huoneenlämmössä. Kun suspensio on sula, siirrä se jälle 45 minuutiksi.
4. Lisää 200 µl 0,5 % SDS, 50 mM Tris (pH 7.5), 0,4 M EDTA, 1 mg/ml proteinaasi K. Siirrä 50 °C lämpöblokkiin (tai vesihauteeseen) 60 minuutiksi.
5. Uuta 600 µl:lla Tris-tasapainotettu fenoli : kloroformi : isoamyyli alkoholi (25:24:1) –seosta. Vorteksoi noin 2 minuuttia. Sentrifugoi 10 000 x g:n voimalla 15 minuuttia. Siirrä yläfaasi uuteen putkeen. Toista uutto.
6. Lisää 0,1 vol 3M natriumasetaattia (sekoita kevyesti), lisää sitten 2 vol jääkylmää absoluuttista etanolia (sekoita kääntämällä putkea kolmesti).
7. Pakasta – 20 °C:ssa yön yli.
8. Sulata ja sentrifugoi 10 000 x g 15 minuutin ajan. Poista supernatantti. Liuota pelletti 50 µl:aan 50 mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA, 200 µg/ml RNase A.
9. Liuota keinuttamalla +4 °C:ssa yön yli.
10. Uuta näytemäärän suuruisella tilavuudella kloroformia (sekoita kääntelemällä) ja sentrifugoi 10 000 x g voimalla 5 minuuttia. Siirrä yläfaasi uuteen putkeen.

11. Lisää 0,1 vol 3 M natriumasetaattia (sekoita kevyesti). Lisää sitten 2 vol jääkylmää absoluuttista etanolia (sekoita kääntelemällä). Sentrifugoi 10 000 x g 15 minuuttia ja poista etanoli. Pese DNA-pelletti 0,5 ml:lla 70 % etanolia. Sentrifugoi 10 000 x g 5 minuuttia ja poista etanoli.
12. Liuota pelletti 20 µl:aan 50 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA.
13. Tarkista puhtaus NanoDropilla.

Työohje II

1. Lisää 500 µl näytteeseen (jos näytetilavuus on pienempi, laimenna näyte 500 µl:aan ennen työn aloittamista) 1 µl 10 µg/ml Proteinaasi K:ta.
2. Siirrä näyte 55 °C lämpöblokkiin 40 minuutiksi.
3. Siirrä näyte -70 °C pakkaseen yön yli.
4. Sulata näyte ja lisää 1 vol fenoli : kloroformi : isoamyylialkoholi (25:24:1) -seosta. Vorteksoi 5 minuuttia.
5. Sentrifugoi 20 °C, 12 000 x g, 2 minuuttia. Siirrä yläfaasi uuteen putkeen.
6. Toista fenoli : kloroformi : isoamyylialkoholiuutto ja sentrifugoi uudelleen 20 °C, 12 000 x g, 2 minuuttia. Siirrä yläfaasi uuteen putkeen.
7. Lisää 0,1 vol 3 M natriumasetaattia. Sekoita kevyesti. Lisää 2 vol jääkylmää absoluuttista etanolia, sekoita kääntelemällä.
8. Siirrä putki -70 °C pakkaseen tunniksi.
9. Sentrifugoi +4 °C, 12 000 x g, 10 minuuttia.
10. Poista supernatantti, lisää 1 ml 70 % etanolia.
11. Sentrifugoi +4 °C, 12 000 x g, 5 minuuttia.
12. Poista supernatantti, kuivaa pelletti kevyesti vakuumikuivaimella.

13. Liuota pelletti 50 µl:aan TE-puskuria. Lisää 1 µl 10 mg/ml RNase A:ta.
14. Siirrä putki 37 °C lämpöblokkiin 1h ajaksi.

NanoDropilla saadut mittaustulokset solupellettien supernatanteista ja PrepMan® Ultra –reagenssilla käsitellyistä näytteistä

NanoDrop ND1000 –spektrofotometrillä tehtyjen mittausten tulokset. PrepMan® Ultra –käsiteltyjen näytteiden mittauksissa nollanäytteenä käytettiin tuoretta PrepMan® Ultra –reagenssia. Solupellettien supernatanttien mittauksissa nollanäytteenä käytettiin Milli-Q-vettä. Kustakin näyteputkesta suoritettiin kolme peräkkäistä mittausta.

Taulukko 1. PrepMan Ultra® -reagenssilla käsitellyt näytteet.

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
<i>S. agalactiae</i>	28,01	0,56	0,275	2,03	3,39
	27,51	0,55	0,26	2,11	3,65
	28,02	0,56	0,288	1,95	3,5
<i>S. bovis</i>	11,81	0,236	0,128	1,84	2,93
	12,48	0,25	0,142	1,76	4,23
	12,52	0,25	0,153	1,64	3,43
<i>S. mitis</i>	69,4	1,388	0,626	2,22	2,15
	69,44	1,389	0,649	2,14	2,13
	70,89	1,418	0,648	2,19	2,13
<i>S. mutans</i>	9,71	0,194	0,115	1,69	1,37
	10,04	0,201	0,127	1,58	4,07
	9,44	0,189	0,12	1,57	3,79
<i>S. pyogenes</i>	11,41	0,228	0,111	2,06	0,57
	11,42	0,228	0,107	2,13	1,67
	11,31	0,226	0,093	2,44	1,81
<i>S. sanguinis</i>	3,8	0,076	0,007	10,67	1,41
	3,9	0,078	0,039	1,98	3,2
	4,63	0,093	0,031	3	3,55
<i>Str. A pos ctl</i>	4,02	0,08	0,009	9,36	0,02
	4,01	0,08	0,025	3,23	0,02
	4,23	0,085	0,032	2,63	0,02

(jatkuu)

Taulukko 1 (jatkuu).

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
<i>H. influenzae</i>	41,5	0,83	0,407	2,04	1,39
	39,85	0,797	0,389	2,05	1,9
	39,64	0,793	0,371	2,14	2
<i>H. parainfluenzae</i>	44,49	0,89	0,431	2,06	2,18
	44,91	0,898	0,45	1,99	2,39
	45,15	0,903	0,461	1,96	2,4
<i>S. aureus</i>	51,85	1,037	0,512	2,02	2,19
	50,96	1,019	0,504	2,02	2,36
	52,42	1,048	0,518	2,02	2,24
<i>S. epidermidis</i>	13,97	0,279	0,15	1,86	0,62
	15,39	0,308	0,198	1,55	0,71
	15,45	0,309	0,207	1,49	0,72

Taulukko 2. Solupellettien supernatanteista suoritettut mittaukset.

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
<i>S. agalactiae</i>	36,26	0,725	0,392	1,85	0,87
	35,94	0,719	0,4	1,8	1,08
	36,61	0,732	0,384	1,91	1,1
<i>S. bovis</i>	51,67	1,033	0,719	1,44	0,64
	53,09	1,062	0,777	1,37	0,66
	53,63	1,073	0,822	1,31	0,67
<i>S. mitis</i>	118,12	2,362	1,175	2,01	1,35
	121,63	2,433	1,199	2,03	1,36
	120,7	2,414	1,176	2,05	1,37
<i>S. mutans</i>	16,54	0,331	0,173	1,91	0,67
	18,12	0,362	0,215	1,69	0,83
	16,95	0,339	0,191	1,78	0,78
<i>S. pyogenes</i>	21,6	0,432	0,228	1,89	0,87
	23,07	0,461	0,273	1,69	1,1
	24,03	0,481	0,281	1,71	1,1
<i>S. sanguinis</i>	31,69	0,634	0,347	1,82	1,03
	31,23	0,625	0,33	1,89	1,1
	30,74	0,615	0,309	1,99	1,11
<i>Str. A pos. ctrl.</i>	-17,11	-0,342	-0,343	1	-0,06
	-17,35	-0,347	-0,329	1,06	-0,06
	-17,99	-0,36	-0,345	1,04	-0,06

(jatkuu)

Taulukko 2 (jatkuu).

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
<i>H. influenzae</i>	39,5	0,79	0,353	2,24	1,07
	43,17	0,863	0,38	2,27	1,55
	44,94	0,899	0,429	2,09	1,59
<i>H. parainfluenzae</i>	139,89	2,798	1,275	2,19	1,93
	143,02	2,86	1,295	2,21	1,97
	143,05	2,861	1,276	2,24	2,15
<i>S. aureus</i>	92,71	1,854	0,918	2,02	1,11
	92,28	1,846	0,883	2,09	1,17
	93,24	1,865	0,88	2,12	1,16
<i>S. epidermidis</i>	37,05	0,741	0,34	2,18	0,94
	37,93	0,759	0,359	2,11	1,06
	36,47	0,729	0,302	2,42	1,01

Koettimien paikat ptsI-geenin sekvenssissä *Streptococcus pyogenes* Manfredo-kannassa

AATGCGTGCGCTTCTTCGCGCCTCTGTTACGGACAACCTTCGTATCATGTT
CCCAATGGTAGCACTTCTTAAAGAATTCCGTGCTGCAAAAGCAGTCTTTGA
CGAAGAAAAAGCAAACCTTGCTTGCAGAAGGCGTTGCGGTTGCTGATGACA
TCCAAGTTGGTATCATGATTGAGATTCCTGCAGCTGCTATGCTTGCAGACC
AATTTGCTAAGGAAGTTGATTTCTTCTCAATTGGAACAAACGACCTTATCCA
ATACACTATGGCAGCAGACCGTATGAACGAACAAGTATCATACCTTTACCA
ACCATACAACCCATCAATATTACGTTTGATCAACAATGTGATCAAAGCAGC
GCACGCTGAAGGTA

Roche ProbeLibrary Probe # 74: GGCAGCAG

Spesifinen koetin: GCTTGCAGAAGGCGTTGCGGTTGCTGATGA

Esimerkki BLAST®-rinnastuksesta

>ref|NC_012891.1| **D** Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis GGS_124 chromosome
1, complete sequence
length=2106340

Features in this part of subject sequence:

phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase

Score = 603 bits (326), Expect = 2e-172
Identities = 356/371 (96%), Gaps = 0/371 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	AATCCCTGCCCTTCTTCCGCCCTCTCTTCAACCCACAACCTTCCTATCATCTTCCCAATCCT	60
Sbjct	1372492	AATCCCTGCCCTTCTTCCGCCCTCTCTTCAACCCACAACCTTCCTATCATCTTCCCAATCCT	1372493
Query	61	AGCACTTCTTAAGAATTCGGTGCTGCAAAAGCAGTCTTTGACGAAGAAAAAGCAAACCTT	120
Sbjct	1372432	AGCACTTCTTAAGAATTCGGTGCTGCAAAAGCAGTCTTTGACGAAGAAAAAGCAAACCTT	1372373
Query	121	GCTTGGCAGAAGGCGTTTGGGTTTCTGATGACATCCAAAGTTGGTATCATGATTGAGATTCC	180
Sbjct	1372372	GCTTGGCAGAAGGCGTTTGGGTTTCTGATGACATCCAAAGTTGGTATCATGATTGAAATTCC	1372313
Query	181	TGCAGGTGCTATGCTTGCAGACCAATTGCTAAGGAAGTTGATTCTTCTCAATTGGAAC	240
Sbjct	1372312	TGCGGCTGCTATGCTTGCAGACCAATTGCTAAGGAAGTTGATTCTTCTCAATTGGAAC	1372253
Query	241	AAACGACCTTATCCAATACACTATGGCAGCAGACCGTATGAACGAACAGTATCATACCT	300
Sbjct	1372252	AAACGATTTAATCCAATACACTATGGCAGCAGACCGTATGAACGAACAGTATCATACCT	1372193
Query	301	TTACCAACCATAACAACCATCAATATTACCTTTGATCAACAATCTCATCAAAACACCCCA	360
Sbjct	1372192	TTACCAACCATAACAACCATCAATCTACGTTTGATCAACAATGTAATCAAAAGCAGGCA	1372133
Query	361	CGCTGAAGGTA	371
Sbjct	1372132	TGCTGAAGGTA	1372122

Streptococcus pyogenes str. Manfredo	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS2096	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS6180	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS9429	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS10270	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS5005	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes N2131	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS10750	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS10394	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes M1GAS	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes MGAS315	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes SSI-1	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes_MGAS8232	AAACGACGTTTATCCCAATACACTATGCCAGCAGACCGGTATGAACGAACAAGTATCATACCT
Streptococcus pyogenes str. Manfredo	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS2096	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS6180	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS9429	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS10270	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS5005	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes N2131	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS10750	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS10394	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes M1GAS	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes MGAS315	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes SSI-1	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes_MGAS8232	TTACCAACCATACCAACCCATCAATATTACGTTTGTATCAACAATGTGATCAAAAGCAGCGCA
Streptococcus pyogenes str. Manfredo	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS2096	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS6180	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS9429	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS10270	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS5005	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes N2131	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS10750	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS10394	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes M1GAS	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes MGAS315	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes SSI-1	CGGTGAAGGTA
Streptococcus pyogenes_MGAS8232	CGGTGAAGGTA

Light Cyclers 480® SYBR Green Master työohje

Laitteet ja välineet

- Roche LightCycler 480® -PCR-laite
- LightCycler480® Multiwell Plate 96
- LightCycler480® Sealing Foil
- Sentrifugi ja Swing-out roottori

Reagenssit

- Light Cyclers 480® SYBR Green Master-kitti (PCR-vesi (väritön korkki) ja
- PCR Master Mix (vihreä korkki))
- Alukkeet (GEPlsIF234 ja TJJTRev)

Ennen aloittamista

- Pidä PCR Master Mix valolta suojattuna. Pidä reagenssit jäähauteessa työskentelyn ajan.
- Sulata yksi Master Mix -putki ja yksi PCR-vesiputki.
- Valmista primerpari-liuos, jonka lopullinen konsentraatio on 0,2 µM (1 µl kumpaakin aluketta + 48 µl vettä)
- Luo LightCycler 480®-PCR-laitteelle ohjelma, jonka parametrit ovat seuraavat:

Setup

Detection Format	Block Type	Reaction Volume
SYBR Green	96	10 µl
Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation	1	none
Amplification	45	quantification
Melting Curve	1	melting curve
Cooling	1	none

(jatkuu)

jatkuu

Temperature Targets				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition (per °C)
<i>Pre-Incubation</i>				
95	none	0:05:00	4.4	-
<i>Amplification</i>				
95	none	0:00:10	4.4	-
57	none	0:00:30	2.2	-
72	single	0:00:20	4.4	-
<i>Melting curve</i>				
95	none	0:00:05	4.4	-
65	none	0:01:00	2.2	-
97	continuous	-	-	5.0
<i>Cooling</i>				
40	none	0:00:10	1.5	-

Työn suoritus

- Valmista riittävä määrä PCR-seosta lisäämällä 1,5 ml eppendorf-putkeen seuraavat komponentit annetussa järjestyksessä. Laimenna myös NPC-kontrollikaivoihin riittävä määrä Master Mixiä.

Komponentti	näytekaivoon tarvittava määrä	NPC-kontrollikaivoon tarvittava määrä
PCR-vesi (putki 2, väritön korkki)	1,5 µl	2,5 µl
Primerpair-liuos	1 µl	-
Master Mix, 2 x konsentroidu (putki 1, vihreä korkki)	5 µl	5 µl
<i>Yhteistilavuus</i>	<i>7,5 µl</i>	<i>7,5 µl</i>

- Sekoita varovasti pipetoimalla edestakaisin, älä vorteksoi.

- Pipetoi 7,5 µl PCR-seosta kuhunkin näytekaivoon ja NC-kontrollikaivoihin. Pipetoi NPC-kontrollikaivoihin 7,5 µl laimennettua Master Mixiä. Pipetoi NTC-kaivoihin 10 µl PCR-seosta.
- Pipetoi kuhunkin näytekaivoon 2,5 µl näytettä. Pipetoi NC- ja NPC-kontrollikaivoihin 2,5 µl PCR-vettä.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F	NC	NC	NC									
G	NTC	NTC	NTC									
H	NPC	NPC	NPC									

NC = negative control; PCR-seos + vesi"näyte"

NTC = no template control; vain PCR-seosta

NPC = no primer control; laimennettu master mix + vesi"näyte"

- Sulje kuoppalevy LightCycler Multiwell Sealing Foil -kalvolla.
- Sentrifugoi kuoppalevyä 1500 x g voimalla 2 minuutin ajan.

Laita kuoppalevy PCR-laitteeseen ja käynnistä ohjelma.

Light Cycler 480® Probes Master työohje

Laitteet ja välineet

- Roche LightCycler 480® -PCR-laite
- LightCycler480® Multiwell Plate 96
- LightCycler480® Sealing Foil
- Sentrifugi ja Swing-out roottori

Reagenssit

- Light Cycler 480® Probes Master-kitti (PCR-vesi (väritön korkki) ja
- PCR Master Mix (punainen korkki))
- Alukkeet (GEpTslF234 ja TJTRev)
- Koetin (Universal ProbeLibrary Probe # 74)

Ennen aloittamista

- Pidä koetinta sisältävät liuokset valolta suojattuna. Pidä reagenssit jäähauteessa työskentelyn ajan.
- Sulata yksi Master Mix -putki ja yksi PCR-vesiputki.
- Valmista Aluke-koetinseos sekoittamalla varovasti 2 µl kumpaakin alukeliuosta ja 4 µl koetinliuosta 32 µl:aan PCR-vettä.
- Luo LightCycler 480®-PCR-laitteelle ohjelma, jonka parametrit ovat seuraavat:

Setup

<i>Detection Format</i>	<i>Block Type</i>	<i>Reaction Volume</i>
Mono Color Hydrolysis Probes	96	10 µl
Programs		
<i>Program Name</i>	<i>Cycles</i>	<i>Analysis Mode</i>
Pre-Incubation	1	None
Amplification	45	Quantification
Cooling	1	None

(jatkuu)

jatkuu

Temperature Targets				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition (per °C)
<i>Pre-Incubation</i>				
95	none	0:05:00	4.4	-
<i>Amplification</i>				
95	none	0:00:10	4.4	-
57	none	0:00:30	2.2	-
72	single	0:00:30	4.4	-
<i>Cooling</i>				
40	none	0:00:10	2.0	-

Työn suoritus

- Valmista riittävä määrä PCR-seosta lisäämällä 1,5 ml eppendorf-putkeen seuraavat komponentit annetussa järjestyksessä. Laimenna myös NPC-kontrollikaivoihin riittävä määrä Master Mixiä.

Komponentti	näytekaivoon tarvittava määrä	NPC-kontrollikaivoon tarvittava määrä
PCR-vesi (putki 2, väritön korkki)	1,5 µl	2,5 µl
Aluke-koetin-liuos	1 µl	-
Master Mix, 2 x konsentroitu (putki 1, punainen korkki)	5 µl	5 µl
<i>Yhteistilavuus</i>	<i>7,5 µl</i>	<i>7,5 µl</i>

- Sekoita varovasti pipetoimalla edestakaisin, älä vorteksoi.
- Pipetoi 7,5 µl PCR-seosta kuhunkin näytekaivoon ja NC-kontrollikaivoihin. Pipetoi NPC-kontrollikaivoihin 7,5 µl laimennettua Master Mixiä. Pipetoi NTC-kaivoihin 10 µl PCR-seosta.
- Pipetoi kuhunkin näytekaivoon 2,5 µl näytettä. Pipetoi NC- ja NPC-kontrollikaivoihin 2,5 µl PCR-vettä.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F	NC	NC	NC									
G	NTC	NTC	NTC									
H	NPC	NPC	NPC									

NC = negative control; PCR-seos + vesi"näyte"

NTC = no template control; vain PCR-seosta

NPC = no primer control; laimennettu master mix + vesi"näyte"

- Sulje kuoppalevy LightCycler Multiwell Sealing Foil -kalvolla.
- Sentrifugoi kuoppalevyä 1500 x g voimalla 2 minuutin ajan.
- Laita kuoppalevy PCR-laitteeseen ja käynnistä ohjelma.